

QP
501
J67

THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY

WITH THE COOPERATION OF

SHIGERU AKAMATSU, Chiba; TORASABURO ARAKI, Kyoto; KIKO GOTO, Kyoto; MOTONOSUKE GOTO, Fukuoka; KIKUNAE IKEDA, Tokyo; KATSUJI INOUE, Sendai; SHICHIZO KATO, Kumamoto; MITSUGI KIKUCHI, Tokyo; KEIZO KODAMA, Fukuoka; CHIKAHIKO KOIZUMI, Tokyo; SHIGERU KOMATSU, Kyoto; YASHIRO KOTAKE, Osaka; KANAYE MAYEDA, Kyoto; KOJI MIYAKE, Sapporo; TAKEYOSHI NAGAYAMA, Tokyo; KAORU OGURO, Sapporo; YUZURU OKUDA, Fukuoka; TAKAOKI SASAKI, Tokyo; GOZO SATO, Keijo; TORAI SHIMAMURA, Tokyo; TAYEI SHIMIDZU, Okayama; KENZO SUTO, Kanazawa; UMETARŌ SUZUKI, Tokyo; YUTAKA TERUUCHI, Tokyo; SHIGERU TODA, Hoten; MASAJI TOMITA, Nagasaki; MAKOTO YAMAKAWA, Tokyo; KIYOHISA YOSHIMURA, Kagoshima.

EDITED BY

SAMURO KAKIUCHI

Professor in the Tokyo Imperial University

VOLUME IX

TOKYO

1928

THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY

WITH THE COOPERATION OF

SHIGERU AKAMATSU, Chiba; TORASABURO ARAKI, Kyoto; KIKO GOTO, Kyoto; MOTONOSUKE GOTO, Fukuoka; KIKUNAE IKEDA, Tokyo; KATSUJI INOUE, Sendai; SHICHIZO KATO, Kumamoto; MITSUGI KIKUCHI, Tokyo; KEIZO KODAMA, Fukuoka; CHIKAHIKO KOIZUMI, Tokyo; SHIGERU KOMATSU, Kyoto; YASHIRO KOTAKE, Osaka; KANAYE MAYEDA, Kyoto; KOJI MIYAKE, Sapporo; TAKEYOSHI NAGAYAMA, Tokyo; KAORU OGURO, Sapporo; YUZURU OKUDA, Fukuoka; TAKAOKI SASAKI, Tokyo; GOZO SATO, Keijo; TORAI SHIMAMURA, Tokyo; TAYEI SHIMIDZU, Okayama; KENZO SUTO, Kanazawa; UMETARO SUZUKI, Tokyo; YUTAKA TERUUCHI, Tokyo; SHIGERU TODA, Hoten; MASAJI TOMITA, Nagasaki; MAKOTO YAMAKAWA, Tokyo; KIOHISA YOSHIMURA, Kagoshima.

EDITED BY

SAMURO KAKIUCHI

Professor in the Tokyo Imperial University

VOLUME IX

TOKYO

1928

COPYRIGHT 1928

BY

THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY

PUBLISHED BY THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY

CONTENTS OF VOLUME IX.

No. 1, April, 1928

	Page
OYAMA, Kensa. Über die Entstehung der alkalischen Reaktion des Darmsaftes.	1
ITO, Kinshiro. Biochemical studies in the equilibrium of the halogen ions. I. On the combination of egg-albumin and the halogen ions...	17
NAITO, Yasushi. On the micro method of the determination of phosphorus in tissue.	45
HIROTA, Kozo. On the conditions which influence the colloidal osmotic pressure of the blood serum.	71
HIROTA, Kozo. On the restitution of the blood fluid after haemorrhage.	87
HIROTA, Kozo. On the empirical equation for gelation velocity.	103
SHIMODA, Tokusaburo. Biochemical studies on uric acid.	117
ANDO, Kunio. On the significance of iron in biological oxidation. I. The role of ferrous salt as aldehydase.	187
ANDO, Kunio. On the significance of iron in biological oxidation. II. The rôle of ferrous salt as oxido-reductase for various organic substances.	201
ANDO, Kunio. Über die Kolloidstabilität schwer löslicher Salze.	215
IZUME, Seiichi and KOMATSUBARA, Isao. Studies on experimental rickets. I. On the antirachitic property of crude "Biosterin", the cholesterin-free, unsaponifiable fraction of cod liver oil.	233
NOSHI, Katsumasa. Hämolyse und Glykolyse.	243
KOBAYASHI, Todi. Über die Pentosurie bei experimentellem Stauungs- ikterus und bei subcutaner Zufuhr der Gallensäuren bei Kaninchen.	251
MURAKAMI, Kanae. Bedeutung der Gallensäure im Kohlenhydrat- stoffwechsel (IV) Antagonistische Wirkung der Gallensäure gegen Adrenalin (I).	261
OKAMURA, Teiji. Bedeutung der Gallensäure im Kohlenhydratstoffwech- sel (V). Über den Einfluss des Gallensäureverlustes und der überschüssigen Zufuhr der Gallensäure auf den Zuckergehalt des Blutes	271
EDA, Genichiro. Einfluss des Ergotamins auf experimentelle Hypergly- kämie.	285

No. 2, July, 1928

TAKU, Aijiro. Über den Einfluss der innersekretorischen Substanzen der Parasympathicusgifte der Alkaloide und der verschiedenen Salze auf die hypoglykämische Wirkung der Gallensäure.	229
MURAKAMI, Kanae. Über die Gallensäurebildung. II. Avitaminosen und Gallensäureausscheidung in der Galle.	321
HATAKEYAMA, Takuichi und OKAMURA, Takeji. Über die Kenntniss	

Contents

von der Fischgalle. III.	333
KAWASHIMA, Shin-ichi. Über den Einfluss der Splanchnicotomie auf die Zuckerausscheidungsschwelle.....	335
KITAGAWA, Matsunosuke. On the signification of some auxosubstances in the urease reaction.....	347
SUGINO, Ryuzo. The effect of the addition of protein on the surface tention of sodium glycocholate solution.....	353
ODA, Toshio. Über die parenterale Zufuhr des Rohrzucker und Invertins	333
HORINO, Keiichi. Über die spezifische Hämolyse. I. Die reversible Adsorption des Hämolsins und des Komplements.....	407
HORINO, Keiichi. II. Fermente in dem Meerschweinchenserum	423
HORINO, Keiichi. III. Das Lysinogen der Erythrocyten und seine neue Reaktion.	435
OKAMURA, Teiji. Bedeutung der Gallensäure im Kohlenhydratstoffwechsel. VI. Über den Einfluss des Gallensäureverlustes und der überschüssigen Gallensäurezufuhr auf den Adrenalingehalt der Nebenniere.	415
UTZINO, Senji. Über die Wirkung der proteolytischen Fermente auf die Benzoyl- und Phtalyl-derivate der Polypeptide. I. Mitteilung: Über die Wirkung des Darmerepsins und der Hefeproteasen auf Phtalylglycylglycin und Phtalyl-diglycylglycin	453
UTZINO, Senji. II. Mitteilung: Über die Wirkung der Gewebsproteasen auf Benzoyl- und Phtalylglycylglycin	465
UTZINO, Senji. III. Mitteilung: Über die Wirkung der Pankreasproteasen Benzoyl- und Phtalylglycylglycin	483

ÜBER DIE ENTSTEHUNG DER ALKALISCHEN REAKTION DES DARMSAFTES.

VON

KENSA OYAMA.

(Aus dem medizinisch-chemischen Institut der Universität Kanazawa
Vorstand: Prof. K. Suto).

(Eingegangen am 2. Januar 1928.)

EINLEITUNG.

Über die Entstehung der Magensäure und des Darmalkalis sind bis jetzt vereinzelte Meinungen geäußert und diskutiert worden. Sie verschaffen uns jedoch noch keine endgültige Aufklärung.

Ich beschäftigte mich bisher mit der Untersuchung über die Resorption des Kaliums und Natriums, wobei die Zeit und das Mengenverhältnis nach der Einspritzung der genannten Salzlösung in den ausgeschalteten Darmkanal geprüft wurde. Dabei stellte sich heraus, dass im Darne mehr Kation als Anion zurückblieb und beide je nach der Qualität der eingespritzten Salze mehr oder weniger alkalisch reagierten. Zur Erklärung dieser Erscheinung habe ich den Gehalt an Salzkomponenten im Darminhalt quantitativ ermittelt, was interessante Resultate ergab, die hier mitgeteilt werden sollen.

UNTERSUCHUNGSMETHODE.

Zur Ermittlung der Alkalinität des Darminhaltes nach der Einspritzung von Alkalisalzen habe ich folgende Versuche angestellt: 1. Es wurden je 20 ccm einer 1/5 Mol-wässrigen Lösung von Kochsalz, Chlorkalium, Chlorammonium, Jodnatrium, einer 10 % igen wässrigen Rohrzuckerlösung, destillierten Wassers etc. in den Darmkanal eingespritzt und die zeitliche Zu- und Abnahme der Alkalinität ermittelt. Als Versuchstiere wurden ein für alle Mal gesunde Kaninchen benutzt. 2. Nach

der Einspritzung der genannten Alkalisalzlösung wurde der Gehalt an Kalium, Natrium resp. Chlor und Jod im Darminhalt quantitativ ermittelt. 3. Nach der Injektion einer Na-freien Alkalisalzlösung wurde der Gehalt des Darminhaltes an Natrium quantitativ ermittelt.

Das Versuchstier wurde in der Rückenlage fixiert, der Bauch aufgemacht, der 40–50 cm lange Leerdarm herausgezogen 50 cm von der Flexura duodenojejunalis entfernt, der Darminhalt mit den Fingern entleert, das obere und untere Ende doppelt unterbunden. Die Innenfläche des ausgeschalteten Darmes wurde mit 10 % iger wässriger Rohrzuckerlösung gründlich ausgespült, und in das Lumen die auf eine geeignete Temperatur erwärmte Probelösung eingespritzt, der Darmkanal in die Bauchhöhle reponiert und die Bauchdecke geschlossen. Nach 1/4 bis 24 Stunden wurde der ausgeschaltete Darmkanal exstirpiert, der Inhalt entnommen und auf den Gehalt an Salzkomponenten untersucht.

Die Messung der Wasserstoffionenkonzentration wurde mittels des Merckschen Universalindikators ausgeführt. Je 2 ccm des zu prüfenden Darminhaltes wurden mit 2–3 Tropfen Indikatorlösung versetzt und gut durchgemischt. Man vergleiche die Färbung des Gemisches mit der beigegebenen Farbenskala!

Die Methode zur quantitativen Bestimmung der Salzkomponenten wurde nach dem von Kramer-Tisdall angegebenen Verfahren ausgeführt. Die zu untersuchende Lösung wurde enteiweisst, mit Salzsäure behandelt, das Kalium nach Kramer d. h. nach dem Oxydationsverfahren titriert, das Natrium nach der Kramer-Tisdallschen Methode und Balintschen Jodmetrie (Balint, 1924) ermittelt, das Chlor nach Ruszniakschem Verfahren, das Jod nach der Oxydation kolorimetrisch bestimmt.

UNTERSUCHUNGSERGEBNISSE.

Versuchsreihe 1.

Eine 1/5 Mol-Kochsalzlösung—PH 6.5—wurde in den ausgeschalteten Kaninchendarm eingespritzt und der Inhalt von Zeit

zu Zeit auf seine Alkalinität geprüft. Die Resultate sind aus der folgenden Tabelle ersichtlich.

TABELLE I.

	m/5 NaCl, vor d. Injektion	Darminhalt, nach d. Injektion				
		1/4 Std.	1/2 Std.	1 Std.	2 Std.	6 Std.
PH	6.5	8.0	8.0	8.0	7.8	8.0

Die genannte Lösung wurde dann im den ausgeschalteten Darmkanal injiziert, nach einer bestimmten Zeit entnommen und der Gehalt des Darminhaltes an Chlor und Natrium quantitativ bestimmt. Die in die Tabelle II eingetragenen Zahlen sind das Mittel von 20 Bestimmungen. Für jede Beobachtung wurden je 5 Kaninchen (Nr. 1 bis 20) benutzt. Zur Genauigkeitsprüfung der Kramer-Tisball-Balintschen und Ruszniakschen Methoden habe ich zuerst bei den 20.0 ccm m/5 NaCl den Gehalt an Na resp. Cl ermittelt. Dabei ergab sich für Na=0.1402 (theor. Wert=0.1420), für Cl=0.0932 (theor. Wert=0.0920) g.

TABELLE II.

	1/5 Mol NaCl, vor d. Injektion	Darminhalt, nach d. Injektion			
		1/4 Std.	1/2 Std.	2 Std.	6 Std.
Flüssigkeits- menge, ccm	20	21	22	26	14
Cl, g	0.1402	0.0747	0.0440	0.0325	0.0200
Resorbiertes Cl, %	—	47	69	77	81
Na, g	0.0932	0.0791	0.0733	0.0557	0.0415
Resorbiertes Na, %	—	15	21	40	55
Überschüssiges Na, g	—	0.0305	0.0447	0.0346	0.0240

Injiziert man bei den Kaninchen Nr. 1—5 in den Darmkanal $1/5$ Mol-Kochsalzlösung, so vermehrt sich der Darminhalt nach einer Viertelstunde um 1 ccm, das pH ist von 6.5 auf 8.0 gestiegen, von der eingespritzten Cl-Menge 47 %, also 0.0655 g und von der Na-Menge 15 %, also 0.0141 g resorbiert, woraus folgt, dass die letztere 0.0305 g, also 39 % der in der zurückbleibenden Lösung enthaltenen Na-Menge, mehr an Überschuss aufweist als die Cl-Menge. Die Flüssigkeitsmenge im Darne von Kaninchen Nr. 6—10 eine halbe Stunde nach der Injektion ist um 2 ccm, das pH von 6.5 auf 8.0 gestiegen, vom Cl resp. Na 69 % resp. 21 % resorbiert. Daraus folgt, dass das letztere im Vergleich mit dem ersteren 0.0447 g, also 61 % des Restes, überschüssig ist. Bei den Kaninchen Nr. 11—15 hat sich die Flüssigkeitsmenge in 2 Stunden 6 ccm, das pH von 6.5 auf 7.8 gesteigert, das Cl resp. Na ist zu 77 % resp. 40 % resorbiert, daher ist das letztere gegenüber dem ersteren 0.0346 g, also 62 % des Restes, überschüssig. Bei den Kaninchen Nr. 16—20 zeigte sich 6 Stunden nach der Injektion eine Flüssigkeitsverminderung von 6 ccm, eine Steigerung des pH von 6.5 auf 8.0 und eine Resorption von 81 % Cl und 55 % Na, so dass das letztere im Vergleich mit dem ersteren 0.0240 g, also 58 % des Restes, überschüssig ist. Bei den Kaninchen Nr. 21—24 wurde nach 12—24 Stunden die ganze Injektionslösung aufgesogen.

Da die Menge des Chlors gegen das Natrium im Darminhalt beträchtlich gering ist und deutlich alkalisch reagiert — Zunahme der Hydroxylionen —, so darf man wohl annehmen, dass die den Na-Ionen entsprechenden Anionen HCO_3' resp. CO_3'' sind, die sich selbstverständlich durch Hydrolyse OH' befreien können.

Versuchsreihe 2.

Bei der Einspritzung der wässrigen $1/5$ Mol-KCl-Lösung — $\text{pH}=6.0$ — in den ausgeschalteten Darm zeigte der Darminhalt schon nach 15 Minuten $\text{pH}=7.5$, nach 30 Minuten denselben Wert, nach 6 Stunden 6.5. Also reagiert der Darminhalt bei allen Fällen mehr oder weniger deutlich alkalisch, wie die

folgende Tabelle zeigt. Der Versuch wurde an demselben Kaninchen ausgeführt.

TABELLE III.

	1/5 Mol-KCl, vor d. Injektion	Darminhalt, nach d. Injektion				
		1/4 Std.	1/2 Std.	1 Std.	2 Std.	6 Std.
pH	6.0	7.5	7.5	7.0	7.0	6.5

Die genannte Lösung wurde in den ausgeschalteten Darm eingespritzt, nach bestimmter Zeit entnommen und der Gehalt des Darminhaltes an Cl, K und Na quantitativ bestimmt. Die in die folgende Tabelle eingetragenen Zahlen sind das Mittel von 6 Bestimmungen. Für jede Beobachtung wurden je 2 Kaninchen (Nr. 25–30) gebraucht.

Bei der Genauigkeitsprüfung der Bestimmungsmethode ergab sich für K=0.1553 (theor.=0.1564) g, für Cl=0.1408 (theor.=0.1420) g.

TABELLE IV.

	1,5 Mol-KCl, vor d. Injektion	Darminhalt, nach d. Injektion		
		1/2 Std.	2 Std.	6 Std.
Flüssigkeitsmenge, ccm	20	20	22	22
Cl, g	0.1408	0.0734	0.0653	0.0310
Resorbiertes Cl, %	—	43	53	78
K, g	0.1553	0.0195	0.0272	0.0163
Resorbiertes K, %	—	87	82	90
Na, g	—	0.0498	0.0338	9.0169
Überschüssiges Na, g	—	0.0136	0.0074	0.0064

Eine halbe Stunde nach der Injektion (Kaninchen Nr. 25-26) ist die Flüssigkeitsmenge nicht verändert, das pH 6.0 auf 7.5 gestiegen, vom Cl 48 % und vom K 87 % resorbiert, aber es beträgt das Na, welches in der Injektionslösung nicht enthalten ist, 0.0498 g. Auch nach dem Abziehen der dem K entsprechen Cl-Menge bleiben noch 0.0557 g Cl zurück. Indessen genügt diese Cl-Menge noch nicht zur Deckung der oben beschriebenen Na-Menge, diese zeigt noch einen Überschuss von 0.0136 g. 2 Stunden nach der Injektion (Kaninchen Nr. 27-28) ist die Flüssigkeit im Darne um 2 ccm vermehrt, das pH von 6.0 auf 7.0 gesteigert, vom Cl 55 % und vom K 82 % resorbiert; da sich aber noch 0.0338 g Na nachweisen lassen, so ist das Na gegenüber dem Cl 0.0074 g überschüssig. 6 Stunden nach der Injektion (Kaninchen Nr. 29-30) zeigt der Darminhalt eine Zunahme von 5 ccm, das pH eine Steigerung von 6.0 auf 6.5, das Cl resp. K eine Resorption von 78 % resp. 90 %, aber da das nachgewiesene Na 0.0169 g beträgt, so ist es im Vergleich mit dem Cl 0.0064 g überschüssig. Kurzum die Resorption von K ist günstiger als die des Chlors, und das Na wird in der entgegengesetzten Richtung in das Darmlumen abgesondert.

Versuchsreihe 3.

1. Bei der Injektion von einem Gemisch von $\frac{2}{5}$ Mol-Kochsalz und $\frac{2}{5}$ Mol-Chlorkaliumlösung zu gleichen Teilen — pH=6.0 — in den ausgeschalteten Darm zeigte sich nach 15 Minuten pH=6.7, nach 30 Minuten 7.5, doch stieg es allmählich ab bis auf 6.5.

TABELLE V.

	$\frac{2}{5}$ Mol-NaCl } aa, $\frac{2}{5}$ Mol-KCl } vor d. Injektion	Darminhalt, nach d. Injektion				
		1/4 Std.	1/2 Std.	1 Std.	2 Std.	6 Std.
pH	6.0	6.7	7.5	7.0	6.5	6.5

Die genannte Lösung wurde in den ausgeschalteten Darm eingespritzt, nach bestimmter Zeit entnommen und der Gehalt des Darminhaltes an Chlor, Kalium und Natrium quantitativ ermittelt. Die in die folgende Tabelle eingetragenen Zahlen sind das Mittel von 6 Bestimmungen. Für jede Beobachtung wurden 2 Kaninchen (Nr. 36 bis 42) benutzt.

Die Genauigkeitsprüfung der Bestimmungsmethode ergab für $\text{Na}=0.0921$ (theor.=0.0920) g, für $\text{K}=0.1541$ (theor.=0.1564) g und für $\text{Cl}=0.2825$ (theor.=0.2840) g.

TABELLE VI.

	2/5 Mol-NaCl 2/5 Mol-KCl } aa vor d. Injektion	Darminhalt, nach d. Injektion		
		1/2 Std.	2 Std.	6 Std.
Flüssigkeitsmenge. cem	20	41	39	55
Cl. g	0.2825	0.1554	0.1610	0.1820
Resorbiertes Cl, %	—	45	43	36
K, g	0.1541	0.0644	0.0100	0.0023
Resorbiertes K, %	—	58	94	98
Na, g	0.0921	0.0990	0.1051	0.1724
Sezerniertes Na, %	—	7	14	87
Überschüssiges Na, g	—	0.0360	0.0064	0.0555

Es zeigt sich also folgendes: Eine halbe Stunde nach der Injektion vermehrt sich (Kaninchen Nr. 37 – 38) die Flüssigkeit um mehr als die doppelte Menge, das pH von 6.0 auf 7.5, vom Cl wird 45 % und vom K 58 % resorbiert, während das Na im Gegenteil eine Zunahme von 7 % aufweist. Gegenüber der Cl-Menge sind, ausserdem dem K entsprechenden Cl, 0.0360 g Na

überschüssig. 2 Stunden nach der Einspritzung (Kaninchen Nr. 39–40) nimmt die Flüssigkeit fast auf das Doppelte zu, das pH steigt von 6.0 auf 6.5, vom Cl wird 43 %, vom K 94 % resorbiert, während sich das Na 14 % vermehrt; also zeigt dieses im Vergleich mit der Cl-Menge minus das dem K entsprechende Chlor einen Überschuss von 0.0064 g. 6 Stunden nach der Injektion (Kaninchen Nr. 41–42) zeigt die Flüssigkeit eine Vermehrung ums fast Dreifache, das pH eine Steigerung von 6.0 auf 6.5 und das Cl resp. K eine Resorption von 36 % resp. 98 %, dagegen zeigt das Na eine enorme Zunahme von 0.0803 g d. h. eine solche von 87 %, somit einen Überschuss von 0.0555 g gegenüber dem Chlor.

Zusammengefasst, wird das K rasch resorbiert, während das Na allmählich an Menge zunimmt, welche Zunahme je nach der Zeit 7 bis 87 %, durchschnittlich 36 % beträgt. Auch die Cl-Menge vermehrt sich etwas. Im Vergleich mit dieser Cl-Menge lässt sich ein Überschuss von 6 bis 56 mg, im Durchschnitt 33 mg Na nachweisen. Also wird das K mit der Zeit immer mehr, das Cl immer weniger resorbiert, das Na in der entgegengesetzten Richtung in das Darmlumen abgesondert, so dass das letztere gegenüber dem Cl einen beträchtlichen Überschuss zeigt. Trotzdem reagiert der Darminhalt nicht so stark alkalisch als bei alleiniger Einspritzung von Chlornatriumlösung. Diese paradoxe Erscheinung, dass der pH-Wert trotz erheblicher Zunahme des Natriums nicht beträchtlich ansteigt, darf man wohl in folgender Weise erklären: Wenn das dem K chemisch nahe verwandte NH_4 im Blut in den Darmkanal eindringt, so wird die Alkalinität durch die Hydrolyse des Ammoniumsalzes abgeschwächt.

2. Vor der Injektion eines Gemisches von wässriger 2/5 Mol-Kochsalz- und 2/5 Mol-Chlorammoniumlösung zu gleichen Teilen in den Darm wurden Cl- und Na-Mengen in 20 ccm dieser Lösung quantitativ bestimmt, was für Cl 0.2810 g und für Na 0.0953 g ergab. Das Ammonium aber wurde nicht direkt bestimmt. Nach 4 Stunden war die eingespritzte Lösung fast ums

Dreifache vermehrt, vom Cl 35 % resorbiert, trotzdem steigt das Na erheblich d. h. auf 69 %, woraus folgt, dass letztere im Vergleich mit der Cl-Menge 0.0425 g überschüssig ist. Dieses Resultat stimmt mit dem des vorigen Versuches fast ganz überein.

Versuchsreihe 4.

1. Bei der Injektion der wässrigen $1/5$ Mol-Chlorammoniumlösung — pH=6.5 — zeigte der Darminhalt nach einiger Zeit eine etwas gesteigerte Alkalinität — pH=7.0 —, die aber bald auf die Norm zurückging, wie aus der folgenden Tabelle erhellt.

TABELLE VII.

	1/5 Mol-NH ₄ Cl vor d. Injektion	Darminhalt, nach der Injektion				
		1/4 Std.	1/2 Std.	1 Std.	2 Std.	6 Std.
pH	6.5	7.0	6.8	6.5	6.5	6.5

20 ccm der genannten Lösung wurden in den ausgeschalteten Darm eingespritzt, nach bestimmter Zeit entnommen, und der Gehalt des Darminhaltes an Cl und Na quantitativ bestimmt;

TABELLE VIII.

	1/5 Mol-NH ₄ Cl, vor d. Injektion	Darminhalt, nach d. Injektion		
		1/2 S'd.	2 Std.	6 Std.
Flüssigkeitsmenge, ccm	20	20	22	21
Cl, g	0.1410	0.0515	0.0173	0.0068
Resorbiertes Cl, %	—	63	88	95
Na, g	—	0.0421	0.0173	0.0085
Überschüssiges Na, g	—	0.0083	0.0061	0.0041

das Ammonium nicht gemessen. Für jede Beobachtung wurden je 2 Kaninchen (Nr. 31 bis 36) benutzt. Die in die folgende Tabelle eingetragenen Zahlen sind das Mittel von 6 Bestimmungen.

Es zeigt sich also, dass 30 Minuten nach der Einspritzung (Kaninchen Nr. 31 – 32) die Flüssigkeitsmenge unverändert blieb, das pH von 6.5 auf 7.0 stieg, vom Cl 63 % resorbiert wurden und das Na, welches in der Injektionslösung nicht enthalten war, 0.0421 g betrug, so dass das letztere gegenüber dem zurückbleibenden Cl 0.0086 g überschüssig war. 2 Stunden nach der Injektion (Kaninchen Nr. 33 – 34) vermehrte sich die Flüssigkeit 2 ccm, kehrte das pH auf die Norm – 6.5 – zurück, wurden vom Cl 0.1237 g also 88 % resorbiert und vom Na 0.0173 g nachgewiesen, so dass der Überschuss des letzteren gegenüber dem Cl mehr als 0.0061 g betrug. 6 Stunden nach der Einspritzung (Kaninchen Nr. 35 – 36) war die Flüssigkeit um 1 ccm vermehrt, das pH gar nicht verändert, vom Cl 0.1342 g d. h. 95 % resorbiert und vom Na 0.0085 g nachgewiesen, woraus folgt, dass der Überschuss des Na gegenüber dem Cl 0.0041 g aufwies. Die anscheinend geringe Zunahme der OH'-Konzentration trotz dem Überschuss des Na im Darne rührt wahrscheinlich von den durch Hydrolyse des Chlorammoniums entstandenen Wasserstoffionen her.

2. Bei der Einspritzung der wässrigen 1/5 Mol-Jodnatriumlösung – pH=6.3 – in den ausgeschalteten Darm zeigte der Darminhalt nach 1/4 Stunde pH=6.8, nach 1/2 Stunde 7.2 und ging nach 6 Stunden wiederum auf den anfänglichen Wert zurück, wie die Tabelle zeigt:

TABELLE IX.

	1/5 Mol-NaJ, vor d. Injektion	Darminhalt, nach d. Injektion				
		1/4 Std.	1/2 Std.	1 Std.	2 Std.	6 Std.
pH	6.2	6.8	7.2	6.8	6.5	6.3

Die genannte Lösung wurde in den ausgeschalteten Darmkanal eingespritzt, nach bestimmter Zeit entnommen, und der Gehalt des Darminhaltes an Jod und Natrium quantitativ bestimmt. Die in die folgende Tabelle eingetragenen Zahlen sind das Mittel von 8 Bestimmungen. Für jede Beobachtung wurden je 2 Kaninchen (Nr. 43 bis 50) benutzt.

TABELLE X.

	1/5 Mol-NaJ, vor d. Injektion	Darminhalt, nach d. Injektion			
		1/4 Std.	1/2 Std.	2 Std.	6 Std.
Flüssigkeitsmenge, ccm	20	23	30	30	18
J, g	0.5330	0.4107	0.3680	0.3094	0.0480
Resorbiertes J, %	—	23	31	42	91
Na, g	0.0962	0.0892	0.0863	0.0669	0.0311
Resorbiertes Na, %	—	8	11	31	68
Überschüssiges Na, g	—	0.0159	0.0199	0.0109	0.0224

Die Genauigkeitsprüfung der Bestimmungsmethode ergab für $\text{Na}=0.0962$ (theor. $=0.0920$), für $\text{J}=0.5330$ (theor. $=0.5080$) g.

Aus der obigen Tabelle erkennt man folgendes: Eine Viertelstunde nach der Injektion (Kaninchen Nr. 43–44) nimmt die Flüssigkeit nur 3 ccm zu, das pH steigt von 6.3 auf 6.8, vom J werden 23 % und vom Na nur 8 % resorbiert, so dass das letztere gegenüber dem ersteren in einer Menge von 0.0159 g überschüssig ist. Die an den Kaninchen Nr. 45 u. 46 angestellten Versuche ergeben eine halbe Stunde nach der Injektion eine Flüssigkeitsvermehrung von 10 ccm, eine Steigerung des pH-Wertes von 6.3 auf 7.2 und eine Resorption von 31 % resp. 11 % beim J resp. Na, also einen Überschuss von 0.0199 g des letzteren gegenüber dem ersteren. Zwei Stunden nach der

Einspritzung (Kaninchen Nr. 47–48) steigt die Flüssigkeitsmenge wie bei den vorigen Versuchen auf 30 ccm an, das pH von 6.3 auf 6.5, und vom J werden 42 %, vom Na 31 % resorbiert, so dass das letztere gegenüber dem ersteren 0.0109 g überschüssig ist. Endlich zeigt sich 6 Stunden nach der Injektion (Kaninchen Nr. 39–40) eine Flüssigkeitsabnahme von 2 ccm, eine Restitution von pH auf 6.3 und eine Resorption von 91 % resp. 68 % beim J resp. Na, sodass das letztere 0.0224 g mehr an Überschuss aufweist als das erstere. Kurzum, es erfolgt der Schwund von Anion d. h. von J im Darne schneller als der von Kation, wie bei Anwendung der Kochsalzlösung; der Überschuss von Na beträgt 11 bis 22 mg, im Mittel 17 mg. Die Alkalinität des Darminhaltes ist ein wenig gesteigert.

3. Bei der Injektion von Wasser – pH=6.5 – in den Darm zeigt der Darminhalt nach 1/4 Stunde pH=7.2, nach 1/2 Stunde 6.75, nach 2 Stunden wieder den anfänglichen Wert. Bei der Einspritzung von wässriger isotonischen Rohrzuckerlösung – pH=6.8 – in den ausgeschalteten Darm zeigte nach 1/4 Stunde pH=7.7, nach 1/2 Stunde 7.3 und nach einer Stunde wieder den anfänglichen Wert. Dieser pH-Wert blieb noch weiter konstant.

TABELLE XI.

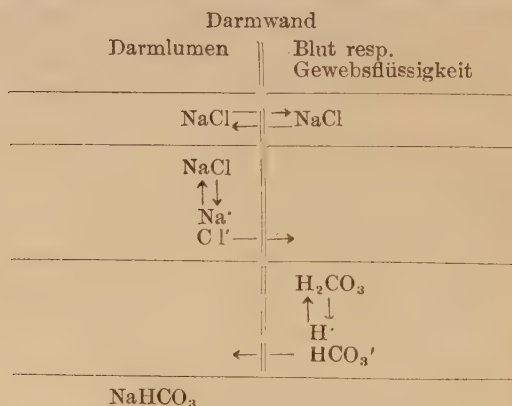
Injektions- flüssigkeit	pH der Injektions- flüssigkeit	pH d. Darminhaltes nach d. Injektion			
		1/4 Std.	1/2 Std.	1 Std.	2 Std.
Wasser	6.5	7.2	6.75	6.75	6.5
Rohrzuckerlösung	6.8	7.7	7.3	6.8	6.8

Aus der obigen Tabelle geht hervor, dass der Darminhalt nach Injektion von Wasser oder wässriger isotonischen Rohrzuckerlösung in den ausgeschalteten Darm eine kurze Zeit schwach alkalisch reagiert.

Durch die obigen Versuche habe ich herausgefunden, dass

nach der Injektion einer Rohrzucker- oder kochsalzfreien Salzlösung in den Darmkanal ein Überschuss von Na, bei der Einspritzung eines Gemisches von $\frac{2}{5}$ Mol-Kochsalz- und $\frac{2}{5}$ Mol-Chlorkaliumlösung zu gleichen Teilen eine Zunahme von Cl und Na vorhanden ist. Es wird also bei relativ guter Resorption des Chlorkaliums das Chlornatrium in das Darmlumen abge sondert. Im Anfangstadium, nach Injektion der genannten Lösung in den ausgeschalteten Darm, wird das Wasser und Kochsalz abgesondert und die eingespritzte Lösung im Endstadium fast ganz aufgesogen. Diese Ergebnisse stimmen mit den meisten Literaturangaben dass Wasser und Salze vom Darme resorbiert und in der entgegengesetzten Richtung in das Darmlumen sezerniert werden, gut überein. Nur nach Cohnheim soll das Kochsalz bei der Einspritzung von Zuckerlösung in den gesunden Darmkanal nicht in die genannte Lösung übergehen, also keine Diffusion erfolgen, die dabei gefundene kleine Menge von Cl und Natriumkarbonat vom Darmsaft herrühren. Aber in Bezug auf die Sekretion des Darmsaftes im ausgeschalteten Darmkanal hat Frerich — nach Zanders Mitteilung — den Katzendünndarm auf eine Strecke von 4 bis 6 cm seines Inhaltes entleert, am oberen und unteren Ende unterbunden, dann in die Bauchhöhle reponiert und 5–6 Stunden danach untersucht, wobei er keinen Tropfen Sekret fand. Dann unterband er den grössten Teil des Darmes an beiden Enden und behandelte auf gleiche Weise wie vorher, wobei auch keine Absonderung beobachtet wurde, Heidenhain hat eine Zeit lang nach der Einspritzung der Kochsalzlösung in den Darm die Alkalinität dieser gemessen, wobei er eine bei weitem grössere Menge von Natriumkarbonat fand als im reinen Darmsaft. Was den Ursprung der Alkalinität betrifft, so hat Gürber durch Versuche erwiesen, dass beim Einwirken der Kohlensäure auf die Erythrozytenaufschwemmung in der physiologischen Kochsalzlösung das vom NaCl frei gewordene Cl' von den Blutkörperchen resorbiert und die Flüssigkeit durch das zugleich gebildete Natriumkarbonat schwach alkalisch wurde. Köppe

nimmt an, dass zwischen Blutkörperchen und Kochsalzlösung das Cl' gegen das HCO_3' vertauscht und dadurch das Natriumbikarbonat gebildet wird; Löwy, Zuntz u. a. haben auch bestätigt, dass durch Umsetzung von Eiweiss und Kohlensäure Azidalbumin und Bikarbonat entstehen. Verschiedene Ionen werden im Darne, wie Höber behauptet, nicht gleichmässig aufgesogen, sondern davon werden die Anionen wie Cl' und J' und die Kationen wie K' und NH_4' schnell resorbiert, dagegen fällt das Na' gar nicht oder nur in einer sehr geringen Menge der Resorption anheim. Über die halbseitige Durchlässigkeit bleiben noch viele Frage offen, aber dass allen Zellen, wie Hamburger der Ansicht ist, eine spezifische Funktion, Substanzen elektiv aufzunehmen, zukommt, wird von zahlreichen Autoren anerkannt. Es ist nicht schwer zu begreifen, dass die Darm-schleimhaut für das Cl' durchlässig ist, aber nicht für das Na' , dass also zwischen dem Darmlumen und dem Blut die Anionen gegeneinander vertauscht und im Darmlumen das Natriumbikarbonat gebildet wird, wie folgendes Schema zeigt:



Also entsteht durch Umsetzung von Kochsalz und Kohlensäure Natriumbikarbonat, wovon die Alkalinität des Darmsaftes ihren Ursprung nimmt. Auch bei fehlendem Kochsalz in der Kost bildet sich das Natriumbikarbonat durch die Einwanderung des Blutkochsalzes in das Darmlumen.

ZUSAMMENFASSUNG.

1. Wässrige Lösung von Kochsalz sowie von Neutralsalzen oder Rohrzucker führt, in den Darmkanal eingespritzt, immer eine Steigerung der Alkalinität herbei, besonders bei Anwendung von Kochsalzlösung.

2. Als ich den Kaninchen eine bestimmte Menge der genannten Lösung in der ausgeschalteten Darmkanal injizierte und eine bestimmte Zeit danach die zurückbleibende Menge der Salzkomponten mass, fand ich, dass die Anionen im allgemeinen besser resorbiert werden als die Kationen und diese, besonders Na^+ in der im Darne zurückbleibenden Flüssigkeit, im Überschuss vorhanden sind.

3. Bei Einspritzung der wässrigen, isotonischen Lösung von Traubenzucker oder anderen Neutralsalzen ausser NaCl z. B. KCl , NH_4Cl oder NaJ in den Darmkanal geht das Blutkochsalz in den letzteren über.

4. Die Anionen, welche den im Darminhalt befindlichen überschüssigen Kationen entsprechen, sind wahrscheinlich HCO_3^- oder CO_3^{--} ; denn die Flüssigkeit im Darne zeigt dabei eine deutliche Alkalinität; mit anderen Worten die Alkalinität des Darmsaftes kommt wohl durch Zusammentreffen des Na -Ions aus dem Kochsalz und HCO_3^- aus dem Blute resp. Gewebsflüssigkeit zum Vorschein.

Zum Schluss sei es mir gestattet, Herrn Prof. Suto für seine lebenswürdige Anregung und Leitung bei meiner Arbeit zu danken. Gleichzeit möchte ich daran erinnern, dass diese Arbeit im Watanabe-Laboratorium des medizinisch-chemischen Institutes der Universität Kanazawa ausgeführt wurde.

LITERATUR.

- Balint (1924), *Biochem. Zeitschr.* **150**.
Bang (1922), *Mikromethode z. Blutuntersuchung*.
Cahn (1886), *Zeitschr. f. physiol. Chemie* **10**.
Hamburger (1904), *Osmot. Druck und Ionenlehre etc.*
Hammarsten (1922), *Lehrbuch d. physiol. Chemie*.

- Helzer (1926), Biochem. Zeitschr. **166**.
Kambayashi (1926), Fukuoka Ika Daigaku Zasshi **10**, Nr. 1.
Köppe (1898), Pflüger's Archiv f. gesamte Physiol. **62**.
Komarow (1924), Biochem. Zeitschr. **146** u. **147**.
Korany u. Richter (1903), Physiol. Chemie u. Medizin **2**.
Lasch (1926), Biochem. Zeitschr. **169**.
Lebermann (1924), Biochem. Zeitschr. **150**.
Pincussen (1923), Mikromethodik. 2 Auflage.
Schmiedeberg (1913), Lehrbucn d. Pharmakologie.
Zander (1851), Liebig's Annalen d. Chemie **79**.
Veil (1925), Handbuch d. biol. Arbeitsmeth. Abt. 4.

BIOCHEMICAL STUDIES IN THE EQUILIBRIUM OF THE HALOGEN IONS. I.

On the Combination of Egg-Albumin and the Halogen Ions.

By

KINSHIRO ITO.

(From the Institute of Anatomy, the Medical College of Kyoto.

Performed under the direction of Asst. Professor

Yoshitaka Katsu.)

(Received for Publication, January 24, 1928.)

INTRODUCTION.

The investigation of ionic activities is one of the most important problems in biology. It would not be too much to say that the physico-chemical biology of the last 20 years was the biology of ionic activities. Especially after the electrometric method for measuring hydrogen ion activity had been developed by S. P. L. Sørensen, L. Michaelis and others, its applications in biology were investigated widely by several scientists. On the other hand the potentiometric method for determining the activity of the alkali metal ions, the halogen ions, etc., were studied by several physico-chemists, and yet there have appeared but few works on its biological applications. We have in consequence taken upon ourselves to make some experiments on the biochemical equilibrium of the halogen ions with the silver halide electrode, and reports of these will be published from our laboratory in a series of papers with the title given above.

Among the halogen ions, the chlorine ion has been studied in regard to the biochemistry of its activity, but the bromine and iodine ions very little. The activity of the chlorine ion is determined in two ways. One way is to measure it by means of the calomel electrode, and the other by means of the silver chloride electrode. The former method was employed by W. Pauli and his collaborators, especially Manabe, Matula,

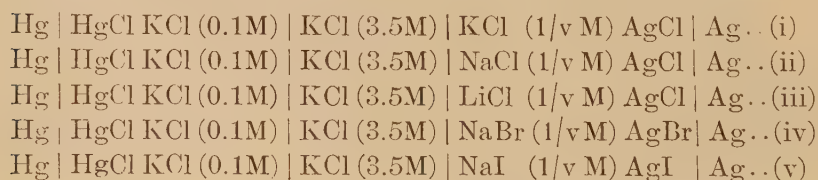
Oryng etc., with attempts to comprehend the combination of protein as well as amino acids with hydrochloric acid or salts. K. Kondo studied also with this method the nature of casein chloride. The latter method was used by A. V. Hill and W. E. L. Brown to evaluate the chlorine ion activity in the plasma of oxidised and reduced blood, by D. I. Hitchcock to study the ionization of the protein chlorides, by B. S. Neuhausen and E. K. Marshall to investigate the physico-chemical condition of the chlorine ion in the blood serum, by O. Barkus to determine the chlorine ion activity in the gastric juice, and recently by Y. Katsu to ascertain the nature of the glycocoll-chlorine ion compound.

The present research was carried out to elucidate the modus of the combination of egg-albumin with halogen ions. With this object in view, first, the activity of the Cl-, the Br- or the I-ion in the N/10—N/1280 KCl, LiCl, NaCl, NaBr and NaI solution respectively was determined by means of the silver halide electrode. Secondly, the activities of the halogen ion in the saline solution mentioned above, having the same molar concentration as in the first case, and containing egg-albumin in a concentration of 0.25%, were estimated by means of the same method.

EXPERIMENT.

I. The Determination of the Halogen Ion Activity in Aqueous Solutions of KCl, NaCl, LiCl, NaBr and NaI.

The measurements of the electromotive forces at 18°C of the following cells were made:—



The alkali halides mentioned above are all of Kahlbaum's

make and are employed at dilutions (V) of 10, 20, 40, 80, 160, 320, 640 and 1280. The dilution of the LiCl solution is somewhat inaccurate but it does not matter, as the present research deals only with the change in the halogen ion activity with the addition of egg-albumin. The method of procedure used in this investigation was based upon the report of Y. Katsu on "an improved method of determining the chlorine ion concentration."

In this paragraph an outline of the method of preparing the silver halide electrode will be briefly mentioned:—A platinum wire 0.5 mm in diameter, and 3 cm in length, is plated with silver, by means of electrolysing the solution containing 1.7% of AgNO_3 and 2.4% of KCN with one accumulator. Here the platinum wire is used as the cathode and a silver rod as the anode. Then having given it a very good wash in distilled water, the surface of the silver-plated platinum wire is coated with a thin layer of AgCl, AgBr or AgI by means of electrolysing the KCl, NaBr or NaI solution at 0.1 N concentration respectively. In this case the silver-plated platinum wire is employed as the anode and a platinum foil as the cathode. In order to make accurate measurements, this procedure must be carried out in a dark room under an indifferent artificial light. The Ag-AgCl electrode thus obtained is, then, washed in distilled water and is fitted up by means of a ground joint with the special electrode vessel, which contains the solution to be examined as the electrode fluid. The outer surface of the electrode vessel is painted with black banana oil to prevent the action of light on the silver halide. (More detailed description of preparing the silver halide electrode will be found in Y. Katsu's paper mentioned above.)

The results obtained are tabulated in Tables I—V. The abbreviations used in these tables have the following significance:—

V: the dilution of the solution.

E: the electro-motive force of the cell (i)–(v).

E takes a positive sign if the calomel electrode serves as the anode of the cell and a negative sign if it serves as the cathode.

\overline{E} : the mean value of the electro-motive force.

$\overline{P_{Cl'}}$: the mean value of $P_{Cl'}$.

$\overline{[Cl']}$: the mean value of the chlorine ion activity.

\overline{E} , $\overline{P_{Cl'}}$ and $\overline{[Cl']}$ are accompanied by their probable error.

The probable error of $\overline{P_{Cl'}}$ and that of $\overline{[Cl']}$ are calculated from the probable error of \overline{E} by means of the law of propagation of errors.

$\overline{P_{Br'}}$, $\overline{P_{I'}}$, $\overline{[Br']}$ and $\overline{[I']}$ have the similar meaning to $\overline{P_{Cl'}}$ and $\overline{[Cl']}$ respectively.

The mean value of the ionic exponent, say $\overline{P_{Cl'}}$, is calculated from \overline{E} by means of the relation:

$$\overline{P_{Cl'}} = \frac{E_0(Cl') - \overline{E}}{0.0577} = -\log [Cl'] \dots \dots \dots (1)$$

where $E_0(Cl')$ is the normal electrode potential of a tenth normal calomel electrode against the $AgCl$ -electrode. $E_0(Cl')$ is calculated by the relation (1), substituting for \overline{E} and $\overline{P_{Cl'}}$, the electro-motive force data of the cell with $N/100$ KCl solution and the chlorine ion exponent computed from the Ghosh equation, namely 2.03499, respectively. $E_0(Br')$ or $E_0(I')$ has a similar meaning to $E_0(Cl')$ and is evaluated in a similar manner, where $N/100$ $NaBr$ or NaI is employed as a standard solution. $P_{Br'}$ or $P_{I'}$ in $N/100$ $NaBr$ or $N/100$ NaI has the same value as $P_{Cl'}$ in $N/100$ KCl , namely 2.03499, according to Ghosh's assumption.

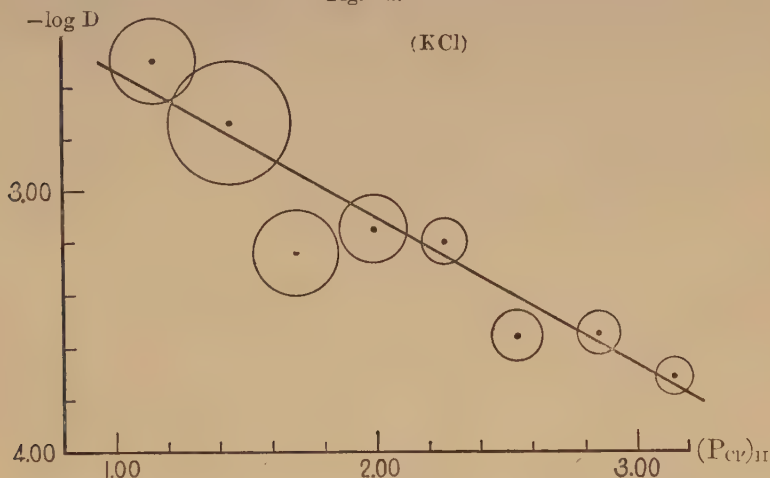
Theoretically speaking $E_0(Cl')$, $E_0(Br')$, and $E_0(I')$ have each a definite value, at a given temperature, with regard to a given reference electrode, say a tenth normal calomel electrode. In practice, however, this value varies sometimes, though to a small extent, with the lapse of time, and this difference is to be attributed to the variation in the single electrode potential of a tenth normal calomel electrode, but how it is so affected is not well known to us. It is advisable, therefore, to evaluate E_0 by the above mentioned procedure, whenever experiments are carried out, in order to obtain an accurate measurement of the ionic activity. Fortunately in the course of the present investigation, such change in E_0 values was not observed, and the following values of E_0 's were employed:

$$E_0 (\text{Cl}') : 0.0985 \quad E_0 (\text{Br}') : 0.2561 \quad E_0 (\text{I}') : 0.4707$$

II. *The Determination of the Halogen Ion Activity in the Solution of KCl, etc., which contains 0.25% of Egg-Albumin.*

The electrometric determinations of halogen ion activities were carried out with a solution each of KCl, NaCl, LiCl, NaBr and NaI, these solutions containing the salt in the same concentration as in the 1st experiment, and egg-albumin in a 0.25 % concentration besides. The egg-albumin used is also of Kahlbaum's make and is previously dialysed with a collodion bag against distilled water, which is changed from time to time. The dialysis is continued till the water outside the membrane shows no more chlorine reaction. It contains 0.21 gram of nitrogen in 100 cc., and measures 6.8—7.1 in P_{H} with the hydrogen electrode.

Fig. 1.



The results obtained are shown in Tables VI to X. (In cases where it is necessary in the following chapter to distinguish the results in Exp. I from those in Exp. II, we shall suffix to the experimental data I and II respectively, say $(P_{\text{Cl}})_{\text{I}}$, $(P_{\text{Cl}})_{\text{II}}$, etc.)

TABLE I. KCl

ν	E	\bar{E}	$\overline{P_{Cl}}$	$\overline{[Cl]}$
10	0.0333 0.0336 0.0333 0.0322 0.0340	0.0333 ± 0.00020	1.135 ± 0.0035	0.0733 ± 0.00059
20	0.0149 0.0185 0.0183 0.0160 0.0185	0.0172 ± 0.00051	1.414 ± 0.0088	0.0385 ± 0.00078
40	0.0022 0.0010 0.0018 0.0030 0.0025	0.0021 ± 0.00022	1.676 ± 0.0038	0.0211 ± 0.00018
80	-0.0148 -0.0128 -0.0138 -0.0149 -0.0155	-0.0144 ± 0.00032	1.962 ± 0.0355	0.0109 ± 0.00014
160	-0.0285 -0.0279 -0.0296 -0.0305 -0.0310	-0.0295 ± 0.00039	2.224 ± 0.0068	0.00598 ± 0.00094
320	-0.0458 -0.0462 -0.0465 -0.0450 -0.0450	-0.0457 ± 0.00021	2.504 ± 0.0036	0.00313 ± 0.000026
640	-0.0592 -0.0610 -0.0625 -0.0650 -0.0575	-0.0610 ± 0.00066	2.770 ± 0.0114	0.00170 ± 0.000045
1280	-0.0720 -0.0760 -0.0750 -0.0800 -0.0770	-0.0760 ± 0.00034	3.029 ± 0.0059	0.000934 ± 0.000013

TABLE II. NaCl

ν	E	\overline{E}	$\overline{E_{Cl}}$	$\overline{[Cl']}$
10	0.0328 0.0307 0.0315 0.0323 0.0322	0.0319 ± 0.00025	1.155 ± 0.0043	0.0700 ± 0.00069
20	0.0160 0.0178 0.0161 0.0174 0.0172	0.0171 ± 0.00025	1.412 ± 0.0043	0.0338 ± 0.00038
40	0.0017 0.0020 0.0009 0.0014 0.0015	0.0015 ± 0.00012	1.632 ± 0.0021	0.0208 ± 0.00010
80	-0.0142 -0.0147 -0.0152 -0.0145 -0.0140	-0.0145 ± 0.00014	1.959 ± 0.0024	0.01098 ± 0.000061
160	-0.0307 -0.0315 -0.0326 -0.0317 -0.0314	-0.0316 ± 0.00021	2.255 ± 0.0036	0.00555 ± 0.000046
320	-0.0432 -0.0470 -0.0467 -0.0475 -0.0463	-0.0461 ± 0.00051	2.507 ± 0.0088	0.00311 ± 0.000063
640	-0.0633 -0.0620 -0.0630 -0.0624 -0.0677	-0.0627 ± 0.00077	2.795 ± 0.0133	0.00161 ± 0.000049
1280	-0.0735 -0.0808 -0.0787 -0.0770 -0.0762	-0.0772 ± 0.00083	3.046 ± 0.0144	0.000900 ± 0.000036

TABLE III. LiCl

ν	E	F	$\overline{P_{Cl}}$	$\overline{[Cl]}$
10	0.0454 0.0457 0.0467 0.0460 0.0459	0.0460 ± 0.00015	0.931 ± 0.0026	0.1173 ± 0.00070
20	0.0299 0.0305 0.0309 0.0300 0.0308	0.0304 ± 0.00014	1.201 ± 0.0024	0.0628 ± 0.00035
40	0.0117 0.0155 0.0175 0.0120 0.0178	0.0149 ± 0.00088	1.470 ± 0.0153	0.0339 ± 0.00119
80	-0.0006 -0.0001 -0.0008 -0.0006 -0.0008	-0.0007 ± 0.00010	1.740 ± 0.0017	0.0182 ± 0.000071
160	-0.0161 -0.0153 -0.0147 -0.0150 -0.0158	-0.0154 ± 0.00017	1.995 ± 0.0029	0.01012 ± 0.000068
320	-0.0304 -0.0301 -0.0287 -0.0309 -0.0285	-0.0297 ± 0.00032	2.243 ± 0.0055	0.00572 ± 0.000072
640	-0.0423 -0.0449 -0.0466 -0.0430 -0.0462	-0.0446 ± 0.00058	2.501 ± 0.0101	0.00316 ± 0.000073
1280	-0.0606 -0.0608 -0.0608 -0.0600 -0.0614	-0.0607 ± 0.00015	2.780 ± 0.0026	0.00166 ± 0.000010

TABLE IV.

NaBr

v	E	\overline{E}	$\overline{P_{Br'}}$	$\overline{[Br']}$
10	0.1893 0.1920 0.1883 0.1909 0.1906	0.1903 ± 0.00042	1.141 ± 0.0073	0.0722 ± 0.0013
20	0.1738 0.1769 0.1729 0.1743 0.1784	0.1753 ± 0.00069	1.401 ± 0.0120	0.0397 ± 0.0011
40	0.1584 0.1598 0.1568 0.1565 0.1634	0.1590 ± 0.00085	1.684 ± 0.0147	0.0208 ± 0.00070
80	0.1432 0.1442 0.1417 0.1431 0.1474	0.1439 ± 0.00065	1.945 ± 0.0113	0.0114 ± 0.00030
160	0.1260 0.1278 0.1260 0.1240 0.1323	0.1272 ± 0.00095	2.235 ± 0.0165	0.00583 ± 0.00022
320	0.1101 0.1122 0.1100 0.1133 0.1169	0.1125 ± 0.00085	2.489 ± 0.0147	0.00324 ± 0.00011
640	0.0950 0.0973 0.0939 0.0895 0.1014	0.0954 ± 0.00132	2.786 ± 0.0229	0.00164 ± 0.000086
1280	0.0800 0.0811 0.0782 0.0783 0.0859	0.0807 ± 0.00095	3.040 ± 0.0165	0.00091 ± 0.000036

TABLE V. (A) NaI

ν	E	E	$\overline{P_{\nu}}$	$\overline{[I']}$
10	0.4138	0.4118 ± 0.00057	1.022 ± 0.0099	0.0952 ± 0.0022
	0.4133			
	0.4101			
	0.4095			
	0.4137			
	0.4131			
	0.4094			
20	0.3938	0.3965 ± 0.00049	1.287 ± 0.0085	0.0517 ± 0.0010
	0.3980			
	0.3958			
	0.3950			
	0.3971			
	0.3972			
	0.3943			
40	0.3832	0.3792 ± 0.00088	1.587 ± 0.0153	0.0259 ± 0.00091
	0.3815			
	0.3751			
	0.3768			
	0.3764			
	0.3835			
	0.3778			
80	0.3671	0.3638 ± 0.00075	1.853 ± 0.0130	0.0140 ± 0.00042
	0.3648			
	0.3630			
	0.3645			
	0.3582			
	0.3668			
	0.3621			

TABLE V. (B) Na I

ν	E	E	$\overline{P_{I'}}$	$\overline{[I']}$
169	0.3488	0.3480 ± 0.00064	2.127 ± 0.0111	0.00746 ± 0.00019
	0.3466			
	0.3483			
	0.3490			
	0.3479			
	0.3517			
	0.3435			
320	0.3325	0.3319 ± 0.00070	2.406 ± 0.0121	0.00393 ± 0.00011
	0.3301			
	0.3345			
	0.3324			
	0.3312			
	0.3354			
	0.3272			
640	0.3148	0.3155 ± 0.00107	2.690 ± 0.0185	0.00204 ± 0.00087
	0.3162			
	0.3210			
	0.3103			
	0.3113			
	0.3208			
	0.3141			
1280	0.2985	0.2974 ± 0.00081	3.004 ± 0.0140	0.000991 ± 0.000032
	0.2985			
	0.2980			
	0.2942			
	0.2942			
	0.3032			
	0.2955			

TABLE VI. KCl + albumin

v	E	E	$\overline{P_{Cl'}}$	$[\overline{Cl'}]$
10	0.0300 0.0328 0.0325 0.0326 0.0330	0.0322 ± 0.00037	1.154 ± 0.0064	0.0701 ± 0.0010
20	0.0141 0.0153 0.0168 0.0170 0.0170	0.0160 ± 0.00039	1.435 ± 0.0068	0.0367 ± 0.00058
40	0.0013 0.0015 0.0010 0.0010 0.0022	0.0014 ± 0.00015	1.688 ± 0.0026	0.0205 ± 0.00012
80	-0.0173 -0.0177 -0.0158 -0.0144 -0.0155	-0.0161 ± 0.00041	1.991 ± 0.0071	0.0102 ± 0.00017
160	-0.0340 -0.0335 -0.0325 -0.0315 -0.0302	-0.0323 ± 0.00046	2.272 ± 0.0080	0.00535 ± 0.000098
320	-0.0485 -0.0485 -0.0475 -0.0500 -0.0455	-0.0480 ± 0.00048	2.544 ± 0.0083	0.00286 ± 0.000055
640	-0.0670 -0.0675 -0.0650 -0.0650 -0.0635	-0.0656 ± 0.00049	2.849 ± 0.0085	0.00142 ± 0.000028
1280	-0.0840 -0.0865 -0.0800 -0.0820 -0.0785	-0.0822 ± 0.00096	3.137 ± 0.0166	0.000730 ± 0.000028

TABLE VII (A) Na Cl + albumin

v	E	\bar{E}	$\overline{P_{Cl}}$	$\overline{[Cl]}$
10	0.0300 0.0305 0.0306 0.0309 0.0309 0.0310 0.0315 0.0315 0.0319 0.0322	0.0311 ± 0.00014	1.1675 ± 0.0024	0.06800 ± 0.00038
20	0.0156 0.0160 0.0161 0.0159 0.0162 0.0160 0.0156 0.0166 0.0183 0.0145	0.0161 ± 0.00020	1.429 ± 0.0035	0.0372 ± 0.00030
40	0.0000 0.0006 0.0004 -0.0008 0.0000 -0.0002 0.0010 0.0017 0.0007 0.0006	0.0004 ± 0.00011	1.715 ± 0.0019	0.01928 ± 0.000084
80	-0.0146 -0.0171 -0.0159 -0.0153 -0.0155 -0.0151 -0.0150 -0.0147 -0.0153 -0.0164	-0.0155 ± 0.00017	1.977 ± 0.0029	0.01055 ± 0.000071

TABLE VII. (B)

Na Cl + albumin

v	E	\bar{E}	$\overline{P_{Cl}}$	$\overline{[Cl]}$
160	-0.0355	-0.0328 ± 0.00032	-2.276 ± 0.0055	0.00529 ± 0.000067
	-0.0331			
	-0.0320			
	-0.0343			
	-0.0341			
	-0.0317			
	-0.0315			
	-0.0315			
	-0.0328			
	-0.0310			
320	-0.0463	-0.0506 ± 0.00064	2.585 ± 0.0111	0.00260 ± 0.000067
	-0.0504			
	-0.0495			
	-0.0490			
	-0.0515			
	-0.0507			
	-0.0490			
	-0.0573			
	-0.0490			
	-0.0534			
640	-0.0660	-0.0651 ± 0.00029	2.836 ± 0.0050	0.00146 ± 0.000017
	-0.0646			
	-0.0623			
	-0.0660			
	-0.0657			
	-0.0652			
	-0.0645			
	-0.0676			
	-0.0635			
	-0.0649			
1280	-0.0792	-0.0825 ± 0.00012	3.138 ± 0.0021	0.000728 ± 0.0000035
	-0.0865			
	-0.0825			
	-0.0806			
	-0.0837			
	-0.0829			
	-0.0807			
	-0.0797			
	-0.0835			
	-0.0853			

TABLE VIII

NaCl + albumin

v	E	\bar{E}	$\overline{P_{Cl'}}$	$[\overline{Cl'}]$
10	0.0458 0.0457 0.0454 0.0457 0.0455	0.0456 ± 0.00005	0.9376 ± 0.0009	0.1154 ± 0.00024
20	0.0307 0.0286 0.0285 0.0290 0.0300	0.0296 ± 0.00028	1.215 ± 0.0049	0.0610 ± 0.00069
40	0.0119 0.0150 0.0134 0.0141 0.0145	0.0138 ± 0.00036	1.489 ± 0.0062	0.0325 ± 0.00046
80	-0.0057 -0.0004 -0.0025 -0.0047 -0.0011	-0.0027 ± 0.00077	1.775 ± 0.0132	0.0168 ± 0.00051
160	-0.0170 -0.0176 -0.0186 -0.0192 -0.0206	-0.0186 ± 0.00042	2.030 ± 0.0073	0.00933 ± 0.00015
320	-0.0322 -0.0327 -0.0332 -0.0339 -0.0340	-0.0332 ± 0.00023	2.282 ± 0.0040	0.00522 ± 0.000048
640	-0.0489 -0.0479 -0.0485 -0.0481 -0.0490	-0.0485 ± 0.00015	2.570 ± 0.0026	0.00269 ± 0.000016
1280	-0.0693 -0.0634 -0.0658 -0.0633 -0.0661	-0.0657 ± 0.00071	2.867 ± 0.0123	0.00136 ± 0.000039

TABLE IX. (A) NaBr + albumin

v	E	\bar{E}	$\overline{P_{Br}}$	$[\overline{Br}]_a$
10	0.1876 0.1789 0.1813 0.1840 0.1895 0.1892 0.1908 0.1905 0.1915 0.1884	0.1872 ± 0.00092	1.195 ± 0.0159	0.0639 ± 0.0023
20	0.1685 0.1649 0.1698 0.1726 0.1740 0.1728 0.1737 0.1761 0.1766 0.1723	0.1722 ± 0.00076	1.455 ± 0.0132	0.0351 ± 0.0011
40	0.1559 0.1463 0.1489 0.1558 0.1584 0.1586 0.1594 0.1600 0.1602 0.1541	0.1558 ± 0.00102	1.739 ± 0.0177	0.0182 ± 0.00078
80	0.1373 0.1236 0.1357 0.1412 0.1423 0.1440 0.1445 0.1449 0.1388 0.1423	0.1395 ± 0.00136	2.022 ± 0.0236	0.00951 ± 0.00052

TABLE IX. (B) NaBr + albumin

v	E	\bar{E}	$\overline{P_{Br'}}$	$[\overline{Br'}]_a$
160	0.1220	0.1206 ± 0.00146	2.349 ± 0.0253	0.00448 ± 0.00026
	0.1202			
	0.1040			
	0.1147			
	0.1246			
	0.1241			
	0.1204			
	0.1251			
	0.1281			
	0.1223			
320	0.1032	0.1052 ± 0.00109	2.616 ± 0.0189	0.00242 ± 0.00011
	0.0953			
	0.1001			
	0.1032			
	0.1098			
	0.1062			
	0.1051			
	0.1106			
	0.1123			
	0.1062			
640	0.0855	0.0874 ± 0.00117	2.924 ± 0.0203	0.00119 ± 0.000056
	0.0777			
	0.0803			
	0.0897			
	0.0918			
	0.0870			
	0.0843			
	0.0924			
	0.0944			
	0.0903			
1280	0.0551	0.0709 ± 0.00146	3.210 ± 0.0253	0.000616 ± 0.000036
	0.0693			
	0.0657			
	0.0733			
	0.0780			
	0.0709			
	0.0698			
	0.0728			
	0.0791			
	0.0746			

TABLE X. (A)

NaI + albumin

v	E	\overline{E}	$\overline{P_{12}}$	$\overline{[I]}$
10	0.4084 0.4090 0.4099 0.4100 0.4104 0.4105 0.4108 0.4108 0.4114 0.4128	0.4104 ± 0.00026	1.0448 ± 0.0045	0.0902 ± 0.00093
20	0.3966 0.3962 0.3883 0.3949 0.3956 0.3963 0.3919 0.3877 0.3950 0.3963	0.3939 ± 0.00072	1.332 ± 0.0125	0.0466 ± 0.0013
40	0.3760 0.3767 0.3703 0.3798 0.3749 0.3763 0.3702 0.3746 0.3790 0.3794	0.3757 ± 0.00073	1.647 ± 0.0127	0.0225 ± 0.00066
80	0.3592 0.3586 0.3563 0.3593 0.3573 0.3493 0.3526 0.3604 0.3646 0.3624	0.3580 ± 0.00095	1.954 ± 0.0165	0.0111 ± 0.00042

TABLE X. (B)

Na I + albumin

v	E	\overline{E}	$\overline{P_1'}$	$\overline{[I']}$
160	0.3432	0.3428 ± 0.00093	2.217 ± 0.0161	0.00606 ± 0.00022
	0.3400			
	0.3399			
	0.3463			
	0.3410			
	0.3480			
	0.3455			
	0.3334			
	0.3440			
	0.3467			
320	0.3284	0.3215 ± 0.00101	2.586 ± 0.0175	0.00259 ± 0.00010
	0.3201			
	0.3161			
	0.3230			
	0.3270			
	0.3128			
	0.3204			
	0.3230			
	0.3245			
	0.3197			
640	0.2945	0.3058 ± 0.00129	2.859 ± 0.0224	0.00139 ± 0.000071
	0.3097			
	0.2978			
	0.3109			
	0.3020			
	0.3070			
	0.3137			
	0.3107			
	0.3112			
	0.3108			
1280	0.2745	0.2841 ± 0.00148	3.235 ± 0.0256	0.000583 ± 0.000034
	0.2805			
	0.2767			
	0.2907			
	0.2817			
	0.2860			
	0.2778			
	0.2855			
	0.2932			
	0.2940			

DISCUSSION.

It may be seen in Tables I to X that the halogen ion activity in each KCl, NaCl, LiCl, NaBr and NaI solution is diminished by the addition of egg-albumin. It is the very object of the present paper to show how the reduction of the ionic activity is effected. For convenience of discussion the diminution in the halogen ion activity D with regard to each salt and each dilution is tabulated in Table XI. Moreover, the percentage diminution, that is to say, the percentage ratio of the diminution in the halogen ion activity to the halogen ion activity of the respective pure salt solution is given in Table XII.

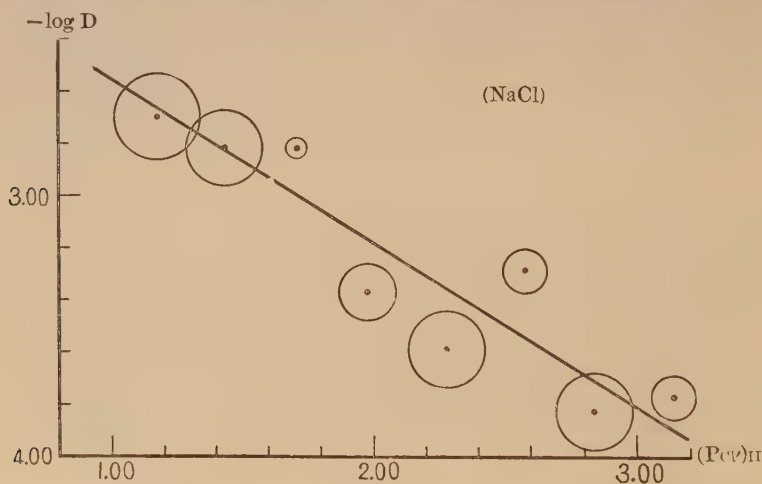


Fig. 2.

The chief point to be noticed in this table is that the percentage diminution increases in all cases with the increasing dilution of the salt solution. This phenomenon suggests to us that the reduction of the ionic activity is most probably due to the adsorption of the ions by the egg-albumin, just as with the adsorption to which the Freundlich isotherm is applicable. In the following, therefore, the applicability of Freundlich's isotherm to the present question will be investigated in a more detailed manner.

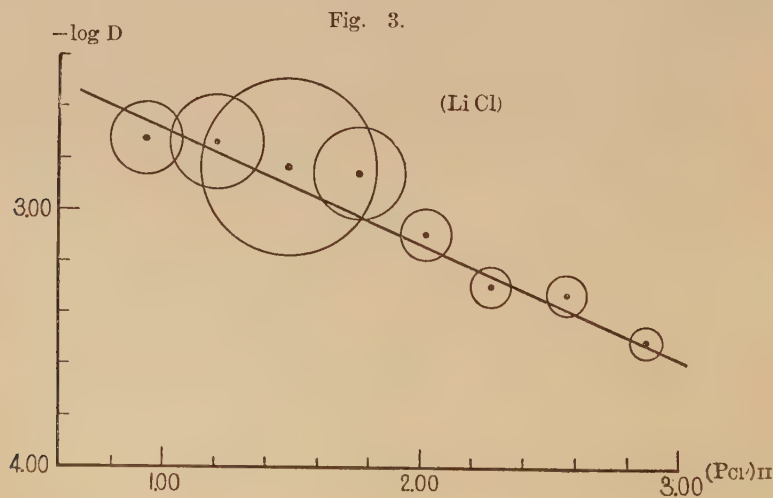
TABLE XI.
D: The diminution of halogen ion activity.

v	KCl	NaCl	LiCl	NaBr	NaI
10	0.00315 ± 0.00116	0.00200 ± 0.00079	0.00190 ± 0.00074	0.00841 ± 0.0026	0.00500 ± 0.0024
20	0.00180 ± 0.00097	0.00152 ± 0.00048	0.00184 ± 0.00077	0.00462 ± 0.0012	0.00409 ± 0.0016
40	0.000581 ± 0.000216	0.00152 ± 0.00013	0.00146 ± 0.00128	0.00248 ± 0.0011	0.00338 ± 0.0011
80	0.000716 ± 0.00022	0.000430 ± 0.000094	0.00140 ± 0.00052	0.00184 ± 0.00060	0.00290 ± 0.00059
160	0.000632 ± 0.000135	0.000260 ± 0.000081	0.00079 ± 0.00017	0.00134 ± 0.00034	0.00140 ± 0.00029
320	0.000275 ± 0.000061	0.000512 ± 0.000092	0.00050 ± 0.000087	0.00819 ± 0.00016	0.00133 ± 0.00015
640	0.000285 ± 0.000053	0.000147 ± 0.000052	0.000465 ± 0.000075	0.000448 ± 0.00010	0.000655 ± 0.00011
1280	0.000205 ± 0.000031	0.000172 ± 0.000030	0.000300 ± 0.000040	0.000295 ± 0.000051	0.000408 ± 0.000047

TABLE XII.

The percentage diminution of halogen ion activity.

ν	KCl	NaCl	LiCl	NaBr	NaI
10	4.3 ± 1.6	2.9 ± 1.0	1.6 ± 0.6	11.6 ± 3.6	5.3 ± 2.5
20	4.6 ± 2.5	3.9 ± 1.2	2.9 ± 1.2	11.6 ± 3.0	8.0 ± 3.1
40	2.8 ± 3.2	7.3 ± 0.6	4.3 ± 3.8	12.0 ± 5.3	13.0 ± 4.3
80	6.6 ± 2.0	3.9 ± 0.9	7.7 ± 2.9	16.3 ± 5.4	20.7 ± 4.3
160	10.6 ± 2.3	4.7 ± 1.5	7.8 ± 2.5	31.1 ± 6.0	18.7 ± 4.1
320	8.8 ± 2.0	16.4 ± 3.0	8.7 ± 1.5	25.3 ± 5.0	35.6 ± 4.0
640	16.8 ± 3.1	9.2 ± 3.3	14.7 ± 2.4	27.3 ± 6.3	32.1 ± 5.5
1280	21.9 ± 3.3	19.1 ± 3.5	18.1 ± 2.4	32.4 ± 5.7	41.2 ± 5.0



Since in the present experiment the quantity of the adsorbent, in other words, that of the egg-albumin, is constant in each case, the diminution in the halogen ion activity (D) is proportional to the amount of halogen ion adsorbed by the unit mass of adsorbing material. Accordingly, the Freundlich adsorption formula becomes

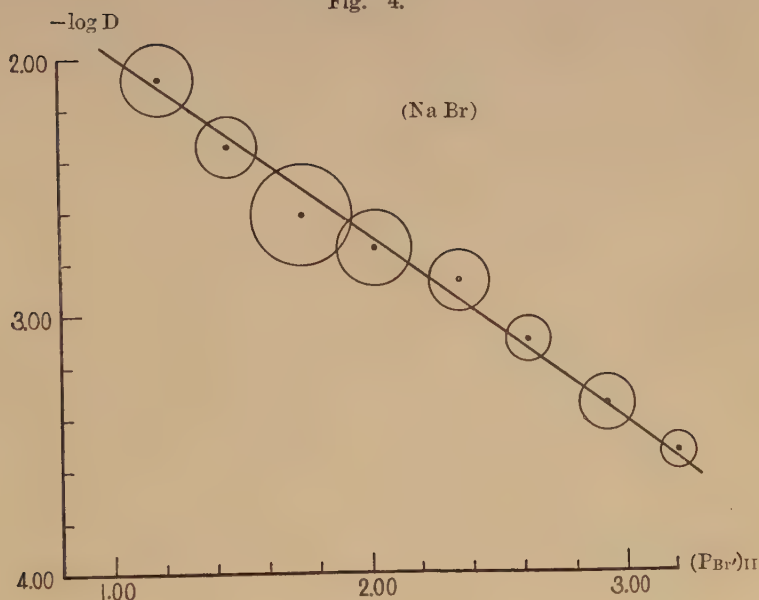
$$D = \alpha C^{\frac{1}{n}} \dots\dots\dots (2)$$

where α and n are each constants at a given temperature with regard to a given ion.

Taking the logarithms on both sides of equation (2), we have

$$\begin{aligned} \log D &= \log \alpha + \frac{1}{n} \log C \\ &= \log \alpha - \frac{1}{n} (P_{\text{halogen ion}})_{II} \end{aligned}$$

Fig. 4.



It is obvious from this equation that the points plotted on the $\log D-(P_{\text{halogenion}})_{\text{II}}$ diagram should fall on a straight line, if the Freundlich formula applies. In order to see this relation $\log D$'s and their probable errors are computed as shown in Table XIII. In Figs. 1—5 $\log D$'s are plotted respectively

TABLE XIII.

-log D.					
v	KCl	NaCl	LiCl	NaBr	NaI
10	2.50 ± 0.16	2.70 ± 0.17	2.72 ± 0.14	2.08 ± 0.13	2.30 ± 0.21
20	2.74 ± 0.23	2.82 ± 0.14	2.74 ± 0.18	2.34 ± 0.11	2.39 ± 0.17
40	3.24 ± 0.16	2.82 ± 0.037	2.84 ± 0.38	2.61 ± 0.19	2.47 ± 0.14
80	3.15 ± 0.13	3.37 ± 0.095	2.85 ± 0.16	2.74 ± 0.14	2.54 ± 0.088
160	3.20 ± 0.093	3.59 ± 0.135	3.10 ± 0.09	2.87 ± 0.11	2.85 ± 0.090
320	3.56 ± 0.096	3.29 ± 0.078	3.30 ± 0.076	3.097 ± 0.085	2.88 ± 0.049
640	3.54 ± 0.081	3.83 ± 0.153	3.33 ± 0.070	3.35 ± 0.097	3.18 ± 0.073
1280	3.69 ± 0.066	3.77 ± 0.076	3.52 ± 0.058	3.53 ± 0.074	3.39 ± 0.050

against either $(P_{\text{Cl}^-})_{\text{II}}$'s, $(P_{\text{Br}^-})_{\text{II}}$'s or $(P_{\text{I}^-})_{\text{II}}$'s and circles are drawn around each point with the radius equal to the probable error of $\log D$. It may be seen that the rectilinear relation between the two variables mentioned above holds good, which gives the basis for the argument that the halogen ions are adsorbed by the egg-albumin. The equations of these straight lines are obtained graphically and the values of the constants α and n calculated as shown in Table XIV.

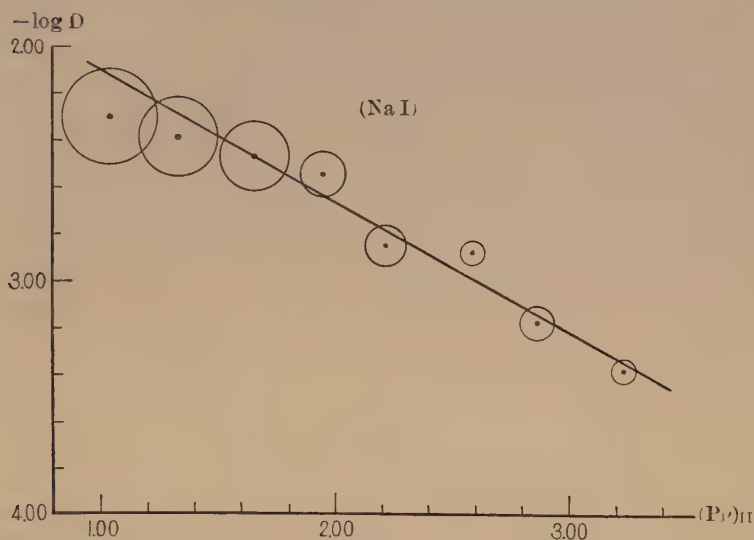


Fig. 5.

TABLE XIV.

Salt	Empirical Equation	α	n
KCl	$\log D + 0.56 (P_{Cl'})_{II} + 1.98 = 0$	0.010	1.79
NaCl	$\log D + 0.63 (P_{Cl'})_{II} + 1.93 = 0$	0.012	1.59
LiCl	$\log D + 0.445 (P_{Cl'})_{II} + 2.255 = 0$	0.006	2.25
NaBr	$\log D + 0.72 (P_{Br'})_{II} + 1.26 = 0$	0.055	1.39
NaI	$\log D + 0.555 (P_{I'})_{II} + 1.565 = 0$	0.027	1.80

Next we will observe the relationship between the percentage diminution of the halogen ion (%) and the halogen ion exponent in Exp. II. For this purpose the sets of corresponding values in Table XII and Tables V—X are plotted in $\%-(P_{\text{halogen ion}})_{II}$ diagram and the points concerning each salt are joined respectively by segments of straight lines, as shown in Fig. 6. On comparing the 5 broken lines thus obtained, namely KCl-, NaCl-, LiCl-, NaBr- and NaI-line, with each other, it may be recognize

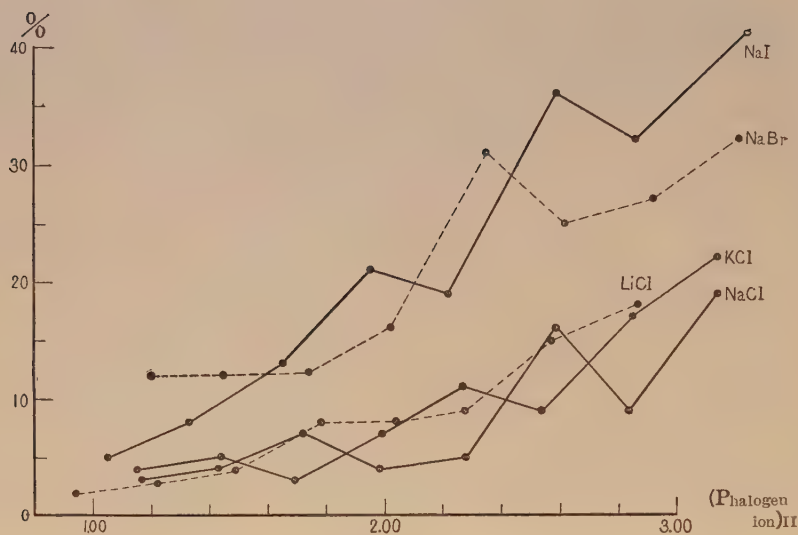


Fig. 6.

as a whole that (1) the percentage diminution increases in each case with increasing $(P_{\text{halogen ion}})_{\text{II}}$; (2) the degree of adsorption of the halogen ion in the solutions of the sodium halides is placed in the following order of effectiveness:—

$$\text{I} > \text{Br} > \text{Cl};$$

and (3) the ability of the chlorine ion to be adsorbed in the solutions of alkali chlorides does not differ from each other. It may be concluded, therefore that it is not the cation but the anion which determines an essential factor in the adsorption of the alkali halides by the egg-albumin.

SUMMARY

The diminution of the halogen ion activity in KCl, NaCl, LiCl, NaBr or NaI solutions by the addition of egg-albumin was observed with the silver halide electrode and this results was attributed to the adsorption of the halogen ions by the egg-albumin.

REFERENCES.

- Barkus, O. (1924): Amer. Journ. of physiol., **68**, 349.
Brown, W. E. L. and Hill, A. V. (1920-1921): Journ. of physiol. **54**,
cxxi.
Hitchcock, D. I. (1923): Journ. of general physiol., **5**, 783.
Katsu, Y. (1927): Journ. of biophysics, **2**, 123.
Kondo, K. (1925): Nippon Nogei Kwagaku Kwaishi, **1**, 171.
Manabe, K. u. Matula, J. (1913): Biochem. Zeitschr., **52**, 369.
Neuhausen, B. S. and Marshall, E. K. (1922): Journ. of biolog.
chem., **53**, 365.
Pauli, W. und Oryng, T. (1915): Biochem. Zeitschr., **70**, 363.

ON THE MICRO METHOD OF THE DETERMINATION OF PHOSPHORUS IN TISSUE.

By

YASUSHI NAITO.

(From the Biochemical Laboratory, Tokyo Imperial University.

Director: Prof. Samuro Kakiuchi)

(Received for publication, January, 26, 1927.)

I. INTRODUCTION.

There has been already half a dozen micro methods for determining phosphorus in tissue introduced in the literature of biochemistry. The accuracy of the methods, however, varies very much according to the quantities of phosphorus to be determined and in many methods the lower limit of the determinable phosphorus amount lies much too high. The method of Embden (1921), for instance, is only applicable between the amounts of 0.5–1.5 mg. P, while Tisdall (1922) and Kuhn (1923) could determine to a lower limit of 0.05 mg. and 0.03 mg. respectively. In the gravimetric method, as in the case with Embden, there is naturally a lowest limit in weight to give a fairly constant result. At the same time the colorimetric methods, although they are easy to perform, are liable to be influenced by many undesirable moments. It seems to me, therefore, the titration methods, like those of Kuhn or Iversen (1920), are preferable to the others. There are, however, many moments to be looked for to obtain a reliable result in these methods. Even the figures enumerated by Iversen are really discouraging. Those who used Iversen's method very often confessed doubt in the accuracy of their results.

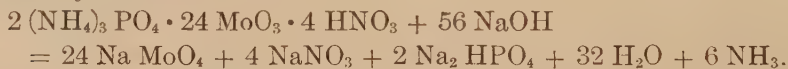
With the purpose in mind to determine the most favourable conditions in the preparation and titration of ammonium phosphomolybdate, and to get, if possible, a much finer method the following experiments were undertaken.

II. THE PRECIPITATION OF PHOSPHORIC ACID AS AMMONIUM PHOSPHO-MOLYBDATE

My method of determining phosphorus content in tissue is related to Neumann's titration method, just as in the case of Iversen's method. It may be necessary therefore, to describe the Neumann method here somewhat in detail.

Neumann's method depends on the principle that the phosphate can be precipitated from solution at a certain acidity containing a certain amount of ammonium nitrate by the addition of ammonium molybdate quantitatively as ammonium phospho-molybdate of a definite composition, when the precipitation occurs at about 80°C.

The ammonium phospho-molybdate precipitated in this way has the formula $(\text{NH}_4)_3 \text{PO}_4 \cdot 12 \text{MoO}_3 \cdot 2 \text{HNO}_3$ and can be decomposed by NaOH as follows.



It is shown here that one molecule of phosphate corresponds to 28 molecules of NaOH, a relation quite favourable for the determination of a minute quantity of phosphorus by titration.

The precipitate of ammonium phospho-molybdate has to be washed free of acid, and to it is added an excess of NaOH. The ammonia is then boiled off, and the remaining NaOH is titrated with acid, phenolphthalein being used as the indicator. From the result of the titration the content of phosphorus can be easily calculated.

Neuman's original method, in which $\frac{N}{2}$ NaOH is used, is applicable for the determination of 15–50 mg. of P_2O_5 . Gregersen, who introduced the overtitration with acid and the boiling off of carbon dioxide, has lowered the limit to 1 mg. P. At last, Iversen studied several moments involved in the method and proposed his modification, which is said to give a good result for the determination of phosphorus even to the amount of 0.015 mg. His method runs as follows.

The Micro Determination of the Tissue Phosphorus. 47

9 cc. of phosphate solution, which contains the requisite amount of ammonium nitrate and sulphuric acid, was just heated to boiling and to it was added 1 cc. of a 10 per cent ammonium molybdate solution. The resulting precipitate of ammonium phospho-molybdate, after being thoroughly washed, was dissolved into a definite amount of $n/25$ -NaOH, which is made up to an excess of about 1–2 cc., with the addition of a certain quantity of water. After the ammonia was boiled off from the solution, the excess of $n/25$ H_2SO_4 was added to it to drive off the carbon dioxide by heating. When cooled, the remaining amount of acid in the solution was titrated back with $n/25$ NaOH. The number of cubic centimeters of $n/25$ NaOH used up was multiplied with the factor 0.0445 to give the quantity of phosphorus in number of milligrams.

Iversen compared the value of phosphorus obtained by his determination method with that of the calculated value as is shown in table I.

The modification introduced by Iversen made possible the determination of a quantity of phosphorus as small as 0.015 mg. When we look into the above table, however, the error is quite large in the case of small quantities of phosphorus. The error to the extent of 20% indicates the unfitness of the method. It is quite hard to understand why Iversen took the average value for the factor from these unreliable figures.

It is clearly shown by Kuhn (1923) that the micro determination of phosphorus in ammonium phospho-molybdate can be easily and most exactly performed by the alkali titration method, especially when the dilute titration fluid is used. It seems to me, therefore, there is room enough to reinvestigate where and how the improvements can be made to get a better result in the determination of small amount of phosphorus.

A. The optimum quantity of acid in the mixture.

From the results of many investigators the most important factor in the precipitation of ammonium phospho-molybdate

TABLE I.

The result of Iversen's method with the varying amounts of phosphorus (by Iversen himself).

No.	n/25 NaOH cc.	P. in mg.		Error	calculated factor
		calculated	found		
1	0.34	0.015	0.015	0.000	0.0442
2	0.37	0.015	0.016	+0.001	0.0406
3	0.39	0.015	0.017	+0.002	0.0384
4	0.29	0.015	0.013	-0.002	0.0517
5	0.29	0.015	0.013	-0.002	0.0517
6	0.40	0.015	0.018	+0.003	0.0375
7	0.64	0.030	0.028	-0.002	0.0469
8	0.75	0.030	0.033	+0.003	0.0400
9	0.67	0.030	0.030	0.000	0.0448
10	0.64	0.030	0.028	-0.002	0.0469
11	0.65	0.030	0.029	-0.001	0.0462
12	0.72	0.030	0.032	+0.002	0.0417
13	0.64	0.030	0.028	-0.002	0.0469
14	1.31	0.061	0.058	-0.003	0.0465
15	1.38	0.061	0.061	0.000	0.0442
16	1.30	0.061	0.058	-0.003	0.0469
17	2.76	0.121	0.122	+0.001	0.0439
18	2.80	0.121	0.124	+0.003	0.0432
19	2.78	0.121	0.123	+0.002	0.0435
20	2.71	0.121	0.120	-0.001	0.0446
Average	—	—	—	—	0.0445

with a definite composition is the quantity of acid present in the solution. Too little of the acid provokes the voluminous white precipitate rich in MoO_3 and the titration with this precipitate leads to too high a value of phosphorus, while in a too acidic solution the precipitation is delayed and at a certain acidity, it does not occur at all. The concentrations of ammo-

The Micro Determination of the Tissue Phosphorus. 49

mium molybdate and ammonium nitrate play not so important a rôle. I have, therefore, examined the influence of the amount of sulphuric acid in the solution on the quantity of the precipitating ammonium phospho-molybdate.

The procedure is as follows: To 1 cc. of the potassium phosphate solution, containing 0.015 mg. phosphorus, was added 3 cc. of 50 gm./dl. ammonium nitrate, a variable quantity (x cc.) of sulphuric acid in different concentrations and $(5-x)$ cc. of water, so that the total volume became 9 cc. The test tube, in which the precipitation was allowed, is made of hard glass and has a width of 2.5 cm. diameter and a length of 23 cm. with a little dilation in the lower end, the volume of the latter part amounting to about 20 cc. The test tube containing the above mixture was placed into a water bath at about 80°C with occasional shaking. After the elapse of 5 minutes 1 cc. of ammonium molybdate, which was also warmed previously to the same temperature, was added and placed gently in the water bath one minute more. The tube was then taken off from the water bath, shaken quite briskly for exactly one minute, placed again in the water bath for a one minute more. This procedure of shaking and warming was repeated four times in all, and then the last—the fifth—shaking was made within the water bath for 1–2 minute. By this manipulation the complete precipitation is secured in so far as precipitation is possible. The test tube was set aside at the room temperature overnight.

For the filtration J. H. Munktell's Unrivalled Genuine Swedish Filtering Paper was selected. This filter paper, which is thin and compact, suits much better for our purpose than that of C. Schleicher and Schüll, giving us an entirely clear filtrate. The filter paper, well fit to the filter, made of hard glass, was previously moistened with hot water to make the pores tight. The precipitate and its mother liquor, were then brought on the filter, a small quantity at a time, preventing the creeping up of the precipitate to the upper edge of the filter. It is also necessary not to let off the fluid entirely from the filter

and to pour on the solution while there is some remaining on the filter. This precaution can prevent the leakage of the precipitate. The precipitate remaining in the test tube is transferred by repeated rinsings with a small volume of ice-cold 20% alcohol, a glass rod with a gum cap being used. The washing of the precipitate on the filter with the ice-cold dilute alcohol, which prevents the creeping up of the precipitate to the upper edge of the filter paper, will be complete when the total wash solution amounts to about 50-60 cc. The complete removal of impurity is secured by the test for the absence of acid in the wash solution by means of test paper. The filter paper with the precipitate is taken off from the filter, and the trace of precipitate adhering on the inside of the filter is swept off by the outside of the folded filter paper. The precipitate together with the filter paper is transferred into a hard glass beaker, 100 cc. in capacity, and to it carefully added 5 cc. of $n/25$ NaOH and some pieces of glass beads. The content of the beaker is then heated to the boiling point and kept gently boiling until the volume has become about half. It is necessary to stir up the contents with a glass rod, made of hard glass, to prevent superheating. During this process the precipitate is decomposed and all of the ammonia is driven off. It is important to finish the concentration at one session. The discontinuation of heating and the reconcentration with the elapse of some interval of time will result in the imperfectness of ammonia depletion. The beaker is removed from the flame, and while hot to it is added 5 cc. of $n/25$ H_2SO_4 . The beaker is again heated over the flame and gently boiled for some time to drive off CO_2 , care being taken to prevent bumping. The beaker is then cooled in running water, the inside being washed down with distilled water free from carbon dioxide until the total volume has become about 50 cc. The titration of the remaining acid is performed with $n/25$ NaOH, 2 drops of phenolphthalein being added as indicator. It is very important to mention, that the acid and alkaline solution used here should have an exact titer and is to

The Micro Determination of the Tissue Phosphorus. 51

be kept from contact with the outside basic or acid gases. The tip of the micro biurette, which contains 2 cc. of solution and is calibrated into 1/100 cc. should be as fine as a hair, so that the time needed to empty out 2 cc. is about 40 sec. During the titration a strong current of air free from CO_2 is blown into the beaker and the content is stirred carefully with a glass rod to aid the distribution of the sodium hydroxide added. The amount of $\text{n}/25$ NaOH solution multiplied by 0.0443 (theoretical factor) indicates the amount of phosphorus in mg.

In table II the results of the determination of phosphorus from the solution with various amounts of sulphuric acid are shown.

TABLE II.

Amount of phosphorus precipitated as ammonium phospho-molybdate from the mixture of 1 cc. of 0.659 g/l KH_2PO_4 (containing 0.015 mg. P. in 1 cc.), x cc. of 20% H_2SO_4 , (5- x) cc. of water, 3 cc. of 50 g/dl NH_4NO_3 , 1 cc. of 10% $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$.

20% H_2SO_4 added (x)	Amount of phosphorus		Percentage of phosphorus recovered
	Calculated	found	
cc.	mg.	mg.	%
0.6	0.015	0.05962	397.5
0.7	0.015	0.01462	97.5
0.8	0.015	0.01440	96
0.9	0.015	0.01418	94.5
1.0	0.015	0.01484	98.9
1.5	0.015	0.01462	97.5
3.0	0.015	0.01440	96
4.0	0.015	0.01462	97.5
5.0	0.015	0.00443	29.5
6.0	0.015	precipitate trace	

As can be seen from the table when the amount of sulphuric acid added is between 0.7 - 4.0 cc. per 10 cc. of the mixture the precipitation of phosphorus as small as 0.015 mg. occurred

almost quantitatively, while an amount smaller than 0.7 cc. called forth a precipitate with a much larger amount of molybdic oxide and an amount larger than 5.0 cc. prohibited the precipitation of phosphorus very remarkably.

B. Quantities of phosphorus determinable by the method described in the previous section.

After I had found out the optimum amount of sulphuric acid which ought to be present in the mixture for the precipitation of phosphorus as ammonium phospho-molybdate I proceeded to examine the range of the amount of phosphorus determinable by the described method. The results with phosphorus solutions of different concentrations are shown in table III.

TABLE III.

Amount of phosphorus in the solution	Amount of ammonium molybdate	Amount of phosphorus precipitated	Percentage of phosphorus recovered
mg.	cc.	mg.	%
0.0075	1	0.00620	82.7
0.0150	1	0.01462	97.5
0.0300	1	0.02924	97.4
0.0600	1	0.05892	97
0.1200	1	0.11917	99.3
0.1500	1	0.13556	90.4
0.1500	2	0.13955	93.4
0.1800	1	0.16125	89
0.1800	2	0.16435	91.3

As is clear from the table the determination of phosphorus smaller than 0.01 is accompanied by a relatively large error. This is quite conceivable when we reflect that 0.01 mg. P. 0.235 cc. of $n/25$ NaOH and the excess or deficit of one drop of this alkaline solution which nearly corresponds to 0.015 cc. will call forth the error of about 7%. In case of 0.005 mg. P. this error will increase to about 14%. We can naturally mini-

mize the error thus produced by using the more dilute normal alkaline solution, say $n/100$. At the same time many other precautions must be observed.

As is seen from the table the upper limit of phosphorus determinable lies tolerably high. It seems to me necessary to increase the amount of ammonium molybdate for the large content of phosphorus.

III. THE DETERMINATION OF PHOSPHORUS IN TISSUE.

As it was known that the determination of phosphorus in amount between 0.015 and 0.12 mg. can be made with the method described above, I proceeded to test the applicability of the procedure for the determination of tissue phosphorus. Iversen (1920), who by searching the amount of sulphuric acid most suitable for the determination of inorganic phosphate (0.015–0.12 mg.) found 0.5 cc. of concentrated sulphuric acid as optimal, assumed 0.7 cc. of sulphuric acid to be used in the decomposition of tissue the best to get good results for phosphorus estimation, stating that about 0.2 cc. of concentrated sulphuric acid may be decomposed during incineration.

The fact, however, being known from the experiment described in the previous section that a slight excess of acid causes really a grave consequence in the determination of phosphorus, and believing the consumption of sulphuric acid in the process of decomposition might be really small in case we used freely an oxidizing agent such as nitric acid or hydrogen peroxide, I have tested the effect of the presence of protein almost free of phosphorus or of olive oil on the amount of sulphuric acid needed for the decomposition of organic substance and for the optimal precipitation.

A. The effect of ovalbumin on the optimal amount of phosphorus.

Ovalbumin was prepared by three times precipitating and dissolving with ammonium sulphate and was coagulated by

heating at isoelectric point, washed with hot water and dehydrated with alcohol and ether. 0.5 gm. of dried ovalbumin thus prepared when decomposed were found almost free from phosphorus (containing only 0.005 mg.). 0.01 gm. of Ovalbumin was decomposed with various amounts of 20% sulphuric acid and nitric acid freed from nitric acid and to it were added various amounts of water so that the total volume became 5 cc. To the mixture then 1 cc. of the phosphate solution, containing 0.015 mg. P. and 3 cc. of 50 g/dl ammonium nitrate solution was added, well mixed and the precipitation of phosphorus was made on the addition of 1 cc. of 10% ammonium molybdate. The results are shown in table IV.

TABLE IV.

20% H ₂ SO ₄ added	Amount of phosphorus		Percentage of recovery
	calculated	found	
cc.	mg.	mg.	%
0.7	0.015	0.01462	97.3
1.4	0.015	0.01440	96
2.1	0.015	0.01418	94.5
3.0	0.015	0.01418	94.5
3.9	0.015	0.01440	96
4.8	0.015	0.00421	28.1

It is clear from the table that by the decomposition of 0.01 gm. ovalbumin with sulphuric acid and nitric acid the decrease in sulphuric acid is not large enough to have an effect on the optimal range of sulphuric acid.

The effect of the addition of olive oil to the test material on the amount of sulphuric acid to be used for decomposition is also insignificant as table V indicates.

We can therefore deduce the conclusion, that the idea of Iversen in which an extra 0.2 cc. of concentrated sulphuric acid was added to cover the loss of sulphuric acid during the decomposi-

TABLE V.

75 drops of olive oil weighing 1.0745 gm. were digested in a Kjeldahl flask with 31.5 cc. of 20 per cent sulphuric acid and oxidized with the aid of concentrated nitric acid. The mixture was diluted with distilled water to 450 cc. 10 cc. of this solution corresponded to 0.7 cc. of the original 20 per cent H_2SO_4 and 5 drops of olive oil.

Amount of 20% H_2SO_4 added	Amount of olive oil	Amount of phosphate-P added	Amount of phosphorus found	Recovering rate of phosphorus added
cc.	dropps	mg.	mg.	%
0.7	5	—	—	—
0.7	5	0.015	0.01440	96
1.7	5	—	—	—
1.7	5	0.015	0.01419	94.6
2.7	5	—	—	—
2.7	5	0.015	0.01440	96
3.7	5	—	—	—
3.7	5	0.015	0.01462	97.3
4.7	5	—	—	—
4.7	5	0.015	0.00443	29.5

tion of test material may be unsound and it is quite necessary to have a more exact test experiment to establish the most favorable acid amount for the determination of tissue phosphorus.

B. The determination of tissue phosphorus by use of various amounts of sulphuric acid for the decomposition of tissue.

In this section the most favorable amount of sulphuric acid for the determination of phosphorus was studied using muscle powder as the testing material. The skeletal muscles of rabbit were minced through a chopping machine, evaporated with addition of alcohol on water bath, powdered by stamping with brass pestle and mortar, and sifted through a sieve of fine meshes. The powder is preserved in a bottle and kept free of moisture.

For the examination of the effect of the amount of acid added it is quite necessary to take an exactly aliquot portion of test material. The weighing of 0.01 gm. of muscle powder, prepared as described above, may cause an error of several percent, due to the hygroscopic nature of the powder and varying humidity. I therefore prepared a stock solution, 10 cc. of which exactly corresponded to 0.01 gm. of the original powder. The solution was made by heating exactly 0.5 gm. of muscle powder with 50 cc. of 20% H_2SO_4 and a sufficient amount of nitric acid in Kjeldahl flask until the solution became decolorized and then to the mixture was added water to 500 cc. in a measuring flask. 10 cc. of such a solution corresponded to the decomposition product from 0.01 gm. of muscle powder with 1.0 cc. of 20% H_2SO_4 . In a series of precipitation tubes 10 cc. of this stock solution were taken and to each tube were added various amounts of 20% H_2SO_4 . The precipitation was made just as stated in section 1, and the results of the titration were compared. At the same time parallel determinations with the same solution in which 0.015 mg. phosphorus added, were performed and the recovery of the added phosphorus was examined. 10 cc. of the solution, which contains 0.015 mg. phosphorus, were added to the stock solution and the mixture was heated to distil off the water. The succeeding method of determination is just as usual. The results are shown in table VI.

It is seen from the table that for the determination of phosphorus in muscle, which contains about 0.08 mg. of phosphorus, 1.0 - 4.8 cc. of 20% H_2SO_4 can be used with fairly exact results. With the H_2SO_4 added in amount larger than 4.8 cc. the precipitation becomes incomplete and the result of the determination is quite undecided. In view of this result the most favorable amount of acid seems to me to lie at about 3.0 cc. There is room enough in this point to avoid the effect caused from varying conditions.

The Micro Determination of the Tissue Phosphorus. 57

TABLE VI.

Total volume from which the precipitation occurred, was 10 cc.

3 cc. of 50 g/dl ammonium nitrate and 1 cc. of 10%

ammonium molybdate were used.

Amount of 20% H ₂ SO ₄	Amount of phos- phate solution added	Phosphorus found	Recovery of phosphorus added.
cc.	cc.	mg.	mg.
1.0	—	0.07841	0.01418
1.0	10	0.09259	
1.2	—	0.07841	0.01418
1.2	10	0.09259	
1.5	—	0.07841	0.01418
1.5	10	0.09259	
1.8	—	0.07841	0.01418
1.8	10	0.09259	
2.1	—	0.08063	0.01417
2.1	10	0.09480	
2.4	—	0.08063	0.01417
2.4	10	0.09480	
2.7	—	0.08018	0.01462
2.7	10	0.09480	
3.0	—	0.08018	0.01462
3.0	10	0.09480	
3.3	—	0.07930	0.01462
3.3	10	0.09392	
3.6	—	0.07886	0.01413
3.6	10	0.09303	
3.9	—	0.07841	0.01418
3.9	10	0.09259	
4.2	—	0.07841	0.01418
4.2	10	0.09259	
4.5	—	0.07664	0.01418
4.5	10	0.04082	
4.8	—	0.07442	0.01418
4.8	10	0.08860	
5.1	—	0.05980	0.01374
5.1	10	0.07354	

C. The amount of tissue phosphorus determinable by the procedure above described.

By the examinations described in previous sections the most suitable condition being elucidated, I tried then to find out the range of the amount of phosphorus determinable under the described conditions. The varying quantities of the stock solution of decomposed muscle corresponding to 0.0005–0.05 gm. of dry muscle powder, were subjected to the determination, 3 cc. of 20% H_2SO_4 being used in all determination. The result is shown in table VII.

TABLE VII.

Amount of muscle powder	Amount of phosphorus		Error	
	calculated	found	Absolute	Percentage
gm.	mg.	mg.	mg.	%
0.0005	0.00390	0.00354	−0.00036	−9.2
0.001	0.00780	0.00753	−0.00027	−3.5
0.0025	0.01949	0.01905	−0.00044	−2.3
0.005	0.03899	0.03854	−0.00045	−1.2
0.01	0.07797			
0.0125	0.09747	0.10012	+0.00265	+2.3
0.015	0.11696	0.12160	+0.00464	+4
0.02	0.15594	0.16014	+0.00420	+2.7
0.03	0.23391	0.24299	+0.00908	+3.9
0.04	0.31188	0.32494	+0.01306	+4.2
0.045	0.35087	0.36769	+0.01682	+4.8
0.05	0.38985	0.37389	−0.01596	−4.1

It can be seen from the table that we can determine with a tolerable degree of accuracy the amount of phosphorus in amount ranging between 0.3–0.03 mg. P. The maximum error lies always under 5 per cent. The limit can be lowered to 0.005 mg. P, if sufficient care be taken. $n/50$ or $n/100$ NaOH could be used instead of $n/25$ NaOH in these cases.

IV. THE USE OF H_2O_2 AS THE OXIDIZING AGENT.

In the method just described the decomposition of tissue was attained by the simultaneous action of sulphuric acid and nitric acid at a high temperature.

Under such conditions, however, there is danger of having the wall of the oxidizing flask attacked, especially just above the border of the liquid and air. It is therefore important as stated above to use a flask or test tube made of hard glass. It is also desirable to avoid any superheating in the decomposition. Recently the use of H_2O_2 instead of nitric acid has been proposed. I have therefore in all of the following cases used hydrogen peroxide in the following way. The commercial hydrogen peroxide has a strength of about 10 volume per cent (about 3 per cent in weight) and is contaminated with a trace of phosphate. I therefore prepared by redistillation a material which was 100 volume per cent strong and contained no phosphorus. When the mixture of muscle powder and sulphuric acid was heated in the digestion tube and became darkened, the flame was removed and a few drops of H_2O_2 added at a time.

When again heated gaseous evolution occurred and the solution became colourless at first. But when the heating was continued and the sulphuric acid became concentrated, the solution darkened again. The addition of H_2O_2 was then followed just as described above. As long as the solution darkened on concentration, the addition of H_2O_2 and subsequent heating were repeated, until on continuous heating the solution was no more darkened. The straw yellow colouring has no injurious effect on subsequent procedure. The precipitation of the phosphate as ammonium phospho-molybdate was performed just the same as in the case of digestion with nitric acid.

V. THE ALCOHOL SOLUBLE AND ALCOHOL INSOLUBLE PHOSPHORUS IN MUSCLE POWDER.

To give a crucial test to our method I proceeded to determine the phosphorus contents of alcohol-ether extracted muscle and its extract and to compare the sum of these values with the phosphorus content determined with untreated original muscle powder.

21.3657 mg. of muscle powder were subjected to a continuous hot alcohol extraction for two days and then to a one day extraction with absolute ether. The remaining muscle powder amounted, when air dried, to 18.6599 gm. The mixture of alcohol and ether extract was filled to 300 cc. in a measuring flask.

The results of phosphorus determination with these alcohol-ether extracted muscle powder and extract are shown in table VIII and IX.

TABLE VIII.

Determination of phosphorus in 0.01 gm. alcohol-ether extracted muscle powder (0.3 gm. of powder being previously partly digested with sulphuric acid, filled up to 300 cc. and 10 cc. of this solution being used for the determination).

Amount of 20% H_2SO_4 added	Amount of phosphate-P added	Amount of phosphorus found	Recovery of phosphorus added
cc.	mg.	mg.	mg.
2.0	—	0.07442	0.01462
2.0	0.015	0.08904	
2.5	—	0.07484	0.01420
2.5	0.015	0.08904	
3.0	—	0.07442	0.01462
3.0	0.015	0.08904	
4.0	—	0.07398	0.01418
4.0	0.015	0.08816	
4.5	—	0.07310	0.01417
4.5	0.015	0.08727	
5.0	—	0.06945	0.01349
5.0	0.015	0.08284	

The Micro Determination of the Tissue Phosphorus. 61

TABLE IX.

Determination of phosphorus in 1 cc. of alcohol-ether extract.

Amount of 20% H_2SO_4 added	Amount of phosphate-P added	Amount of phosphorus found	Recovery of phosphorus added
cc.	mg.	mg.	mg.
2.0	—	0.07132	0.01430
2.0	0.015	0.08562	
3.0	—	0.07177	0.01417
3.0	0.015	0.08594	
4.0	—	0.07132	0.01462
4.0	0.015	0.08594	
5.0	—	0.06911	0.01373
5.0	0.015	0.08284	

As seen in these tables about 3 cc. of 20% sulphuric acid is again verified as quite satisfactory, no matter whether the material is mainly composed of nitrogenous or fatty substance.

Calculation.

0.01 gm. of original muscle powder corresponds to
 $\frac{18.6599}{21.3657} \times 0.01 \text{ gm} = 0.00873 \text{ gm. alcohol-ether extracted muscle powder and}$

$\frac{300}{21.3657} \times 0.01 \text{ cc.} = 0.14 \text{ cc. alcohol-ether extract.}$

Phosphorus contained in 0.00873 gm. alcohol-ether extracted muscle powder

$$\frac{0.00873}{0.01} \times 0.07442 \text{ mg.} = 0.06512 \text{ mg.}$$

Phosphorus contained in 0.14 cc. alcohol ether extract

$$\frac{0.14}{1.0} \times 0.07177 \text{ mg.} = 0.01005 \text{ mg.}$$

Sum of amount of phosphorus contained in alcohol-ether extracted muscle powder and extract corresponding to 0.01 gm. of original powder is therefore

$$0.06512 \text{ mg.} + 0.01005 \text{ mg.} = 0.07517 \text{ mg.}$$

Amount of phosphorus contained in 0.01 gm. of original powder 0.07797 gm.

Difference 0.07797 mg.—0.07517 mg.=0.0027 mg.

Percentage of difference 3.5%

The result might be said to be quite satisfactory.

VI. THE DETERMINATION OF PHOSPHORUS IN TOTAL BLOOD AND PLASMA.

*The comparison of the accuracy of my method
with that of Iversen.*

The best amount of sulphuric acid for the determination of phosphorus in total blood (0.3 cc.) and plasma (0.5 cc.) was studied and found out to be the same as in the case of muscle, i. e. 3 cc. of 20% H_2SO_4 .

9 cc. of total blood or 15 cc. of plasma were digested with 60 cc. of 20% H_2SO_4 and a sufficient amount of H_2O_2 and afterward filled with water to 300 cc. 10 cc. of this solution were taken into each of a series of digestion tubes and the necessary amount of 20% H_2SO_4 added, so that each tube contains 2.0, 2.5, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0. and 7.0 cc. of 20% H_2SO_4 . Digestion and precipitation of phosphate were performed as usual. The result is shown in table X and XI.

As the table indicates the tolerable amount of sulphuric acid lies below 5 cc. of 20% H_2SO_4 . A small increase of sulphuric acid over this upper limit calls forth an abrupt decrease of phosphorus value. 3 cc. of 20% H_2SO_4 can therefore be taken as well suited amount for our purpose.

Iversen proposed the use of 0.7 cc. of concentrated sulphuric acid for digestion of 0.3 cc. of total blood or of 0.5 cc. of blood plasma. 0.7 cc. of concentrated sulphuric acid corresponds to 5.6 cc. of 20% H_2SO_4 and according to my results is the amount just outside of the upper amount. Because of his assumption of the necessity of an additional 0.2 cc. of concentrated sulphuric acid in the estimation of phosphorus in tissue the optimal amount for the case of phosphate solution remains in doubt and because

The Micro Determination of the Tissue Phosphorus. 63

TABLE X.
Determination of total blood phosphorus.

Amount of 20% H_2SO_4 added	Amount of phosphate-P added	Amount of phosphorus found	Recovery of phosphorus added
cc.	mg.	mg.	mg.
2.0	—	0.12051	0.01462
2.0	0.015	0.13512	
2.5	—	0.11961	0.01462
2.5	0.015	0.13428	
3.0	—	0.11872	0.01418
3.0	0.015	0.13290	
4.0	—	0.11828	0.01462
4.0	0.015	0.13290	
5.0	—	0.11784	0.01373
5.0	0.015	0.13157	
6.0	—	0.00177	0.00532
6.0	0.015	0.00709	
7.0	—	Precipitate trace	
7.0	0.015		

TABLE XI.
Determination of phosphorus in plasma.

Amount of 20% H_2SO_4 added	Amount of phosphate-P added	Amount of phosphorus found	Recovery of phosphorus added
cc.	mg.	mg.	mg.
2.0	—	0.04652	0.01461
2.0	0.015	0.06113	
3.0	—	0.04430	0.01440
3.0	0.015	0.05870	
4.0	—	0.04209	0.01417
4.0	0.015	0.05626	
5.0	—	0.03987	0.01373
5.0	0.015	0.05360	
6.0	—	0.00886	0.01063
6.0	0.015	0.01949	
7.0	—	Precipitate trace	
7.0	0.015		

the proof for obtaining the constant result with this amount is still lacking I proceeded to determine the phosphorus with the same blood and plasma by Iversen's method and by mine. The result of the comparison is shown in Table XII and XIII.

TABLE XII.
Amount of phosphorus in 0.3 cc. of blood.

No.	Iversen's method (0.7 cc. conc. H_2SO_4)	My method (3 cc. of 20% H_2SO_4)
	mg.	mg.
1	0.05118	0.10411
2	0.05207	0.10233
3	0.03827	0.10411
4	0.04228	0.10366
5	0.04406	0.10322
6	0.03516	0.10278
Average	0.04387	0.10333

TABLE XIII.
Amount of phosphorus in 0.5 cc. of plasma.

No.	Iversen's method (0.7 cc. of conc. H_2SO_4)	My method (3 cc. of 20% H_2SO_4)
	mg.	mg.
1	0.01558	0.04386
2	0.02225	0.04386
3	0.02203	0.04364
4	0.02336	0.04430
5	0.03629	0.04519
6	0.02715	0.04364
7	0.02626	0.04364
8	0.02492	0.04386
Average	0.02598	0.04400

The Micro Determination of the Tissue Phosphorus. 65

As is seen from the table in my method, where 3 cc. of 20% H_2SO_4 were used, it gives a good consistent value of phosphorus while in Iversen's method the value is low and quite variable, a difference amounting to over 20%. This result tells us explicitly that the amount of sulphuric acid in the case of Iversen's method is too much and the precipitation is incomplete. Although Iversen did not give any remark as to the time needed for precipitation, I always let the precipitate stay over night just as in my case. That many who determined the phosphorus content of blood and other tissue by Iversen's method, expressed the inconsistency of their results may be thus understood quite well. They ought to reduce the amount of sulphuric acid to get a real value or rather to increase to get none of the precipitate.

VII. THE COMPARISON OF THE NEW METHOD WITH THE BELL-DOISY COLORIMETRIC METHOD MODIFIED BY BRIGGS.

As is known to all the Bell-Doisy colorimetric method modified by Briggs gives us a quite easy and comfortable method for the determination of phosphorus in a number of tissues, in so far as the amount of phosphorus is not too small. When however the material and its content of phosphorus is small the comparison of the developed color with the standard becomes so difficult that the readings show a considerable degree of fluctuation. This is especially true when the strength of light weakens. I have therefore studied to define how far the Briggs method can be used and to know when titration method becomes necessary.

A. *The minimal dosis of phosphorus which can be determined colorimetrically by the Briggs method.*

To test the reliability of colorimetrical determination at different concentrations of phosphorus a series of phosphate

TABLE XIV.

A.

Number of reading	0.2 mg.	0.13 mg.	0.1 mg.	0.05 mg.	
1	20.0	20.3	20.1	20.0	39.8*
2	20.0	20.0	20.0	19.8	40.1*
3	20.1	20.1	20.1	20.1	40.2*
4	19.9	20.1	20.0	20.2	39.9*
5	20.2	20.0	20.0	20.0	39.8*
6	19.9	20.0	20.2	19.7	39.2*
7	20.2	20.2	20.2	20.0	39.3*
8	20.0	20.0	20.2	20.0	38.8*
9	20.1	20.0	20.3	19.9	38.6*
10	20.0	20.0	20.2	20.0	38.7*
Average	20.04	20.07	20.13	19.97	39.44*
11	20.0	20.3	20.1	19.8	37.95*
12	20.1	20.3	20.1	19.5	39.16*
13	20.2	20.0	20.0	19.5	37.95*
14	20.1	20.3	20.1	19.1	37.35*
15	20.0	20.0	20.2	19.3	37.59*
16	20.0	20.0	20.0	19.2	37.95*
17	20.2	19.8	20.0	19.6	37.83*
18	20.0	20.0	20.2	19.6	37.35*
19	20.0	20.0	20.0	19.2	36.99*
20	20.1	19.8	20.1	19.1	37.35*
Average	20.07	20.05	20.08	19.39	37.7*
21	20.1	20.0	20.1	19.3	37.11*
22	20.0	20.1	20.2	19.3	37.59*
23	20.0	20.0	20.1	19.2	37.11*
24	20.0	20.0	20.0	19.1	36.99*
25	20.0	19.8	20.0	18.7	37.59*
26	20.0	20.2	20.1	18.8	37.71*
27	20.0	19.6	20.0	18.4	37.59*
28	20.2	19.8	20.0	18.8	37.23*
29	20.2	19.5	20.0	18.7	37.83*
30	20.0	19.6	20.0	18.5	37.35*
Average	20.05	19.86	20.05	18.88	37.41*

* Standard at 40 mm.

The Micro Determination of the Tissue Phosphorus. 67

B.

Deviation (%) among averages of each ten readings.

Concentration of phosphate-P	First ten readings	Second ten readings	Third ten readings
0.2 mg.	+0	-0.5	± 0
0.13 "	-0.8	± 0	+0.8
0.1 "	-1	± 0	± 0
0.05 "	± 0	+4	+6
	+2	+6	+6

solutions of 0.2, 0.13, 0.1 and 0.05 mg. was made and in each of the experiments the same solution after coloration was put into the cups on each side of the Dubosq colorimeter. The layer of the solution in one side was fixed as 20 mm. and the height of the layer of the solution in the other side, which gives the same intensity of coloring, was read. 30 readings were taken in each experiment and the average value in every ten readings were compared.

The results of there readings shows as table XIV indicates that the colorimetric readings give a reliable value as long as the concentration remains tolerably high, and when the concentration is as low as 0.05 mg. the variation becomes really considerable and one can not have any confidence in the reliability of the result.

B. The comparison of the reliability between two methods.

To test the reliability of the result in the determination of phosphorus by Briggs colorimetric method and by my method a definite amount of phosphorus was added to the same digested whole blood and plasma solution and its recovering amount examined by both methods. The results, which are shown in table XV indicate that the colorimetric method gives a fairly good value as long as the total amount of phosphorus in the solution lies above 0.1 mg. In an amount less than 0.05 the

colorimetric method becomes quite unreliable, while the titration method gives a very good value.

TABLE XV.

Amount of blood = 0.3 cc.

Amount of plasma = 0.5 cc.

Amount of phosphate-P added = 0.015 mg.

Amount of P	Briggs' method	Titration method
Blood	0.1344 mg.	0.11872 mg.
Blood+phosphate	0.1475 "	0.13290 "
Phosphate-P recovered	0.0130 "	0.01418 "
Recovering rate	87%	95%
Plasma	0.05740 mg.	0.04430 mg.
Plasma+phosphate	0.06180 "	0.05870 "
Phosphate-P recovered	0.00440 "	0.01440 "
Recovering rate	29%	96%

C. Discussion.

The Briggs colorimetric method is recommendable so long as the amount of phosphorus in the ashed solution lies above 0.1 mg, but is to be discarded for the determination of a smaller amount. The titration method enjoys an application for a broader range of phosphorus amount.

SUMMARY.

From the descriptions stated in the foregoing sections the following points will be evident.

1. In the determination of a small amount of phosphorus as ammonium phospho-molybdate the most important factor is the acidity of the solution. A little too much acid makes the precipitate incomplete. For the determination of phosphorus from 0.1-0.005 mg. contained in tissue the most suitable amount of sulphuric acid is estimated as 3 cc. of 20% H_2SO_4 . The tissue and sulphuric acid are heated in a digestion tube made of hard

The Micro Determination of the Tissue Phosphorus. 69

glass over a direct micro burner until the content darkens.

2. The digestion of the tissue may be performed either by heating the above mixture with concentrated nitric acid or concentrated H_2O_2 . Over heating has to be avoided. A precise description is given on page 50 and page 59.

3. To the digested mixture is added 3 cc. of 50 gm./dl. ammonium nitrate and a sufficient amount of water to make the whole volume 9 cc. It is then heated up to about 80°C and 1 cc. of 10% ammonium molybdate added. Precipitate is better put aside over night.

4. The washing of ammonium phospho-molybdate is carried out by means of 20% alcohol.

5. For the alcalimetry of the ammonium phospho-molybdate $\text{n}/25$ NaOH and $\text{n}/25$ H_2SO_4 are used. The final titration with $\text{n}/25$ NaOH ought to be under a current of CO_2 -free air.

6. The amount of sulphuric acid recommended by Iversen is much too high.

7. The Briggs colorimetric method can not be used when the amount of phosphorus in the resulting solution becomes as small as 0.05 mg., while the titration method can be used for an amount as low as 0.03 mg.

I wish to express my sincere thanks to Prof. Samuro Kakiuchi for his encouragement and advice throughout the course of this work.

REFERENCES.

- Bell, R. D. and Doisy, E. A. (1920): J. of Biol. Chem. **44**, 55.
Briggs, A. P. (1922): J. of Biol. Chem. **53**, 13.
Briggs, A. P. (1924): J. of Biol. Chem. **59**, 255.
Embden, G. (1921): Z. f. physiol. Chem. **113**, 138.
Gregersen, J. P. (1907): Z. f. physiol. Chem. **53**, 453.
Iversen, P. (1920): Biochem. Z. **104**, 15.
Kuhn, R. (1923): Z. f. Physiol. Chem. **129**, 64.
Neumann, A. (1902/1903): Z. f. Physiol. Chem. **37**, 115.
Tisdall, F. F. (1922): J. of Biol. Chem. **50**, 329.

ON THE CONDITIONS WHICH INFLUENCE THE COLLOIDAL OSMOTIC PRESSURE OF THE BLOOD SERUM.

(Studies on the Colloidal Osmotic Pressure
of the Blood Fluid. I.)

By

KŌZŌ HIROTA.

(From the Institute of Physiology, Kyoto Imperial University.
Performed under the direction of Prof. R. Shoji.)

(Received for publication, January 28, 1928.)

INTRODUCTION.

The colloidal osmotic pressure of the protein solution had been more or less vaguely studied by many investigators (Moore and Parker, Reid, Lillie, Moore and Roaf), until the problem was precisely investigated by Sørensen. He prepared the egg albumin and measured the osmotic pressure of their solutions by the direct method devised by him, which gave a very accurate result, though the elaboration of the measurement was considerable. His studies give us a fundamental knowledge of the problem of the osmotic property of protein solutions.

From the chemical point of view, it is more interesting to separate each component of the plasma proteins and study their osmotic properties apart. From physiological interest, however, the colloidal osmotic properties of the plasma protein as a whole is significant, as this colloidal pressure acts to attract water together with its crystalloid solutes through the capillary wall into the blood.

So far as I know, Starling is the first, who measured the osmotic pressure of all the protein in the blood plasma or serum. After him, Cohnstein, Roth, Oker-Blom, Moore and Parker, Verney, and some others made the same measure-

ment. Their experimental methods, except Verney's, were imperfect when compared with that of Sørensen, and moreover, they left almost untouched the conditions of the outer liquid which may influence the colloidal osmotic pressure of the blood fluid. It seems important, however, to study the influence of these conditions, such as the concentration and ionic actions of the salt solutions used as the outer liquid. Verney measured the colloidal osmotic pressure of human blood serum and the effect of dilution on it. This has also an important significance on the problem of lymph formation, though he did not discuss it.

In order to elucidate these points, the present investigations were attempted.

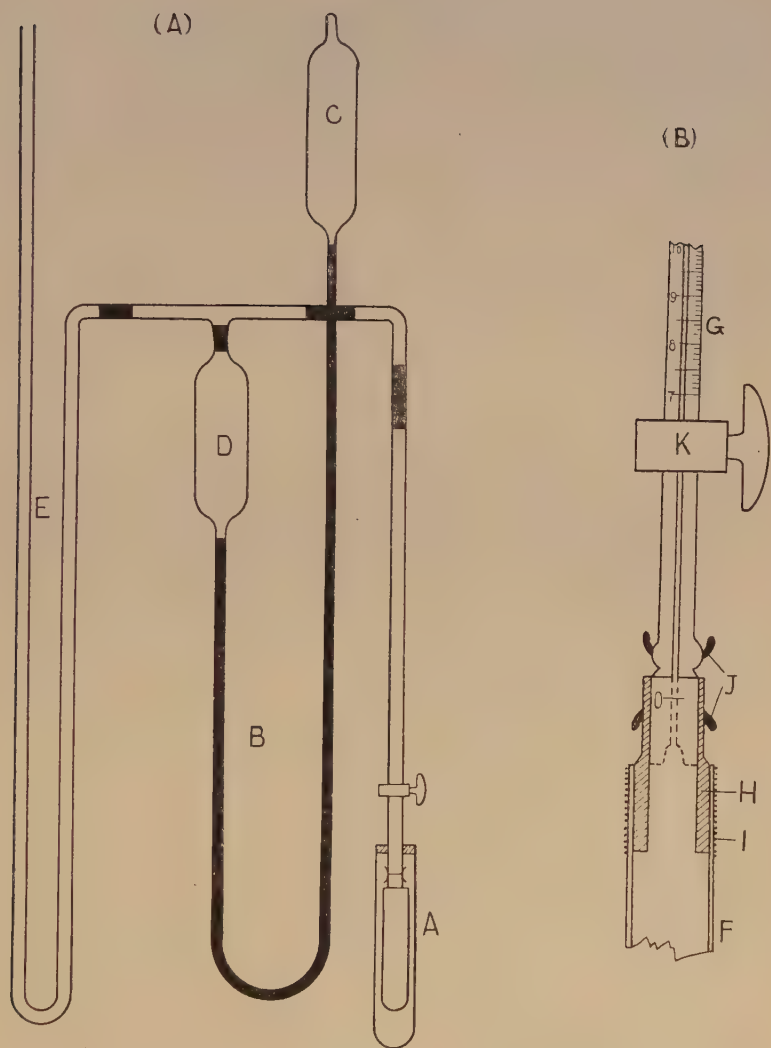
THE APPARATUS AND PROCEDURE OF THE MEASUREMENT.

As to the osmometer and the principle of the measurement, Sørensen's original device was followed. But, as there were tried several modifications of the handling of the apparatus and of the procedure of the measurement, we will summarize them. As to the details of the method, I refer the reader to Sørensen's original paper.

Fig. 1 (A) is the outline of the whole arrangement. *A* is an osmometer composed of a collodion cap containing the protein solution, and a capillary tube attached to the cap, the level of the solution being situated at a certain point of the tube. The part consisting of *B*, *C* and *D* is a counter-pressure arrangement, so that the pressure applied on the capillary level of the solution can be adjusted at will by leveling the sealed bulb *C*. *E* is a water manometer on which the counter-pressure applied is read.

1. *The counter-pressure arrangement.* In Sørensen's original method the bulbs *C* and *D* and the rubber tubing *B* connecting them were filled with water. We found it more convenient to fill the bulb *D* and a greater part of the rubber tubing with mercury, and above it with water in the bulb *C*. By this modification the volume of these two bulbs was reduced and manipulation was facilitated.

Fig. 1.



2. *Osmometer.* The principal parts of it are shown in Fig. 1 (B). *F* is the collodion cap of which the details are described below. *G* is a graduated capillary tube with a tap

K. The bore of the tube is about 0.31–0.46 mm, which is much narrower than that used by Sörnesen. *H* is a small glass piece fitted to the lower end of the capillary tube by a ground joint, and serves as a supporter of the collodion cap. Both *H* and the lower part of the capillary tube have the hooks *J* in opposite positions, which are fastened by means of a rubber loop. The scale of our osmometer was made about 1/5 of Sørensen's original size.

3. *Collodion cap.* Collodium, prepared by Mr. Koidzumi by nitrification of filter paper, was dissolved in an ether-alcohol mixture and caps were made with it after Sørensen's description. The cap was so made as to contain 4.0–4.9 cc. of the blood material, and was immersed in 28 cc. of the outer liquid. The glass piece *H* was fitted in the opening of the cap and it was tied up repeatedly with silk thread *I*. This, of course, should be made perfectly watertight, otherwise the measurement would have failed. The cap thus arranged was preserved in water, and on its use, it was first washed with the solution used for the outer liquid of the osmometer, and after the drops of the solution had been wiped off from the inner surface of the cap, it was filled with the sample for measurement, the plasma or serum, and then the capillary tube, already cleaned and dried, was fitted in the piece *H*. Sørensen used a capillary pipette to adjust the level of the sample and to take off air-bubbles coming occasionally into the tube. In our osmometer, however, the capillary tube was very narrow as mentioned above, so that it was impossible to use such a capillary pipette, and consequently great skill and precaution were necessary to bring the level to a suitable position, and to avoid the occasional insertion of air-bubbles. Then the hooks *J* were fastened with rubber loops, the tap *K* was shut, and it was immersed in the outer liquid (28 cc. in every case) in a thermostat at 37°C. After 20 minutes the immersion of the osmometer was fixed at a position at which its zero mark (from which the graduation of the capillary tube was started) was brought just on the level of

the outer liquid, and then the top of the capillary tube was connected with the counter-pressure arrangement.

Now, suppose that the tap K is open and a counter-pressure p_m in the water manometer is applied, and the level of the inner liquid stands still at a height h above the level of the outer liquid, then the osmotic pressure of the inner liquid P is given by

$$P = p_m + p_c - c = p_m + hd - c$$

where d is the specific gravity of the inner liquid and accordingly p_c is the hydrostatic pressure of the water post in the capillary tube, and c the capillarity action of it, which is to be measured directly with each capillary tube.

In the practical observation it is almost impossible so to adjust the counter-pressure as to keep the capillary level standing still at the initial position, but it goes up or down according to whether the total counter-pressure $p_m + p_c - c$ is less than or exceeds the osmotic pressure P . And, when the difference between P and $p_m + p_c - c$ is not marked, the velocity of displacement of the capillary level is proportional to this difference of the pressure. Thus, if v_1 or v_2 be the displacement of the level per unit time, when the counter-pressure is p_1 or p_2 respectively, the following relation is held, as was pointed out by Sørensen.

$$\frac{P - p_1}{v_1} = \frac{P - p_2}{v_2} = \frac{p_1 - p_2}{v_2 - v_1} = \alpha$$

α is a constant, specific to each cap, and also depends on the inner liquid, and the period and other conditions of the experiment, so that it is to be determined by two successive observations as described above at each measurement. Then we have

$$P - p_1 = \alpha v_1$$

or

$$P = p_1 + \alpha v_1$$

If we observe v_1, v_2, v_3 , etc. corresponding to p_1, p_2, p_3 etc., α is computed more accurately by plotting v against p . In our experiments the capillary level was observed by means of a micro-

scope with 35 scale divisions for 1 mm. and was expressed by the number of divisions which the level travelled for 10 minutes. The values of the pressure were all given in the scale of the water manometer in cm.

The influence of temperature variation should be considered. Sørensen kept the outer liquid in a Dewar vessel and inserted a Beckmann thermometer in it. We did not use the Dewar vessel, but kept the outer liquid in a suitable glass tube and immersed it in a thermostat of a capacity of about 25L. A Beckmann thermometer was inserted in another tube similarly filled with the liquid, and this tube was also immersed in the thermostat close to the former. The temperature of the thermostat was regulated constantly with a deviation within 0.01°C .

Now we want to find the deviation of the capillary level k caused by a temperature deviation of 0.001°C . Suppose the sectional area of the capillary is s , the expansion coefficient of the inner liquid δ , and its total volume τ , then we have

$$k = \frac{\tau\delta}{1000s} \times 35 \quad \text{scale divisions,}$$

and therefore, if a temperature variation of τ in the unit of 0.001°C takes place during one observation of v , then the observed v should be corrected by the term of $+k\tau$. With our apparatus, k was found to be 0.077–0.188.

As to the elasticity of the cap, Sørensen's statement was confirmed. That is to say, when the counter-pressured is changed, the displacement of the capillary level occurs at first suddenly, but continues with a uniform velocity after a few minutes. Therefore, if we take the reading of v , not directly, but a few minutes after the counter-pressure is changed, making this time interval equal in each observation, we can escape from the error due to the elasticity of the collodion cap. In our country, however, there is a difficulty on this point. The room temperature may often change during this time interval, and consequently

The Colloidal Osmotic Pressure of the Blood Serum. 77

a variation of the pressure of the air part in the counter-pressure arrangement may take place, which may disturb the observation. For this reason, the temperature of our laboratory room was also regulated to avoid any sudden variation in it.

EXPERIMENTS.

Experiments were performed in most cases with the serum of defibrinated horse blood. Table I gives, as an example, detailed figures of the measurement in the experiment carried out with 0.9 % NaCl solution as the outer liquid. In other tables given below, detailed figures are omitted and only the results of the osmotic pressure are shown.

TABLE I.

Osmometer No. 1 $c=3.44$ $k=0.0913$ Sp. gravity of serum = 1.028
 No. 2 3.77 0.1088 Outer liquid: 0.90 % NaCl solution.
 No. 3 4.12 0.2300 All 4 osmometers were fitted up at
 No. 4 3.66 0.1177 4 p.m. 26/V, 1926.

Date & No.	Temp. C	v (obs)	v (cor)	p _m cm.	p _s cm.	p _m + p _s - c cm.	α	αv	P cm.	Mean cm.
27/V No. 1	36.972	+ 2.9	+ 2.9	20.86	8.02	25.44	0.110	+0.32	25.76	25.77
	36.971	+ 1.5	+ 1.3	21.03		25.61		+0.15	25.76	
	36.945	- 1.2	- 1.7	21.34		25.92		-0.18	25.74	
	36.960	- 3.2	- 2.5	21.50		26.08		-0.27	25.81	
28/V No. 2	37.081	+ 8.6	+ 8.5	20.71	8.43	25.37	0.060	+0.51	25.88	25.96
	37.088	+ 0.3	+ 0.1	21.33		25.99		+0.01	26.00	
	37.084	- 8.3	- 8.1	21.88		26.54		-0.49	26.05	
	37.083	-20.3	-20.3	22.48		27.14		-1.22	25.92	
29/V No. 3	36.985	+ 9.9	+ 8.9	20.14	8.53	24.55	0.053	+0.47	25.02	25.11
	36.981	+ 0.2	+ 0.2	20.76		25.17		+0.01	25.18	
	36.984	- 1.1	- 1.1	20.92		25.33		-0.06	25.27	
	36.987	-12.1	-12.2	21.25		25.66		-0.65	25.01	
	36.980	-18.1	-18.2	21.64		26.05		-0.96	25.09	
30/V No. 4	37.052	+ 9.1	+ 9.1	20.38	8.43	25.15	0.090	+0.82	25.97	25.82
	37.052	+ 2.0	+ 1.9	20.76		25.53		+0.17	25.70	
	37.052	- 1.5	- 1.5	21.13		25.90		-0.14	25.76	
	37.053	- 5.1	- 5.5	21.56		26.33		-0.49	25.84	

*I. How long does it take for establishment
of the osmotic equilibrium ?*

A NaCl solution of 0.1–4.0 % was taken as the outer liquid, and the measurement was carried on for 4 days with each osmometer. Results are given in Table II, in which it may be seen that the osmotic pressure attained a constant value already after 24 hours, when the outer liquid was concentrated above 0.5 %, while below 0.3 % of it the equilibrium state was not attainable even after 4 days. Thus it was confirmed that, it is enough to leave it to equilibrate for 24 hours before observations, when an isotonic NaCl solution is taken as the outer liquid.

TABLE II.

outer liquid (NaCl)	Osmotic pressure measured after			
	1 day	2 days	3 days	4 days
0.1 %	36.60	35.26	31.56	30.60
0.3	35.04	33.64	30.88	30.19
0.5	25.17	24.95	24.76	24.87
0.9	25.47	25.99	25.54	25.29
0.9	28.50	28.13	28.03	28.12
1.5	24.28	24.03	24.23	24.25
3.0	26.26	25.97	25.89	26.13
4.0	25.84	25.57	25.91	25.79

II. Influence of the concentration of the outer liquid.

One and the same serum was measured with the outer liquid of 0.1–4.0 % NaCl solution respectively. With the 0.1 % and the 0.3 % the observation was continued till the 5th day when the constant values were attained. For others two days were enough. Two series were carried out, in the second of which the P_n value of the outer liquid was also measured. As may be seen in Table III, the osmotic pressure of the serum

TABLE III.

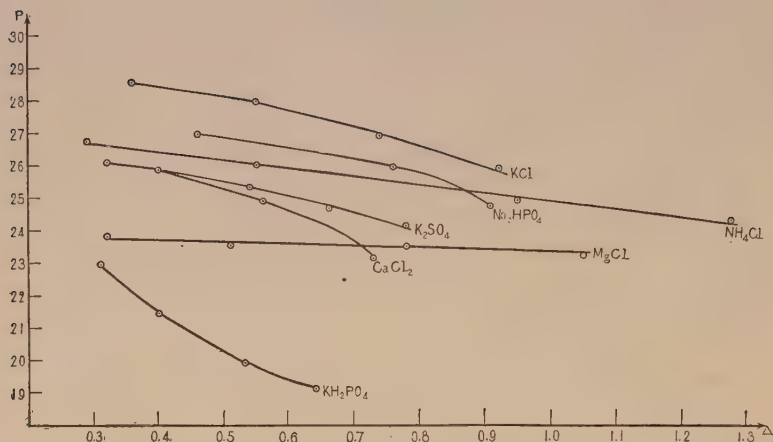
outer liquid (NaCl)	I	II	
	osm. press.	osm. press.	P_H
0.1 %	36.14	34.36	6.65
0.3	30.06	30.73	6.66
0.5	29.56	28.30	6.50
0.7	—	28.27	6.62
0.9	28.46	27.94	6.85
1.5	26.31	27.78	6.59
2.0	36.18	27.19	6.58
3.0	25.23	26.58	6.80
4.0	23.84	25.32	6.72

protein is reduced by the increase in the concentration of the NaCl solution used for the outer liquid. This may be understood by the explanation that, when the outer liquid is concentrated, the salt ions enter into the inner liquid and augment the aggregation of protein particles, while when the outer liquid is diluted, the process is just the reverse.

III. Influence of the kind of salts in the outer liquid.

Similar experiments were carried out with solutions of KCl, CaCl_2 , MgCl_2 , NH_4Cl , KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , and K_2SO_4 as the outer liquid. With one kind of salt, solutions in 3 or 4 different concentrations were prepared and the colloidal osmotic pressure P of the same serum was measured with each of these solutions as well as 0.90 % NaCl solution as the control. The freezing point depression Δ of these solutions were also determined. The results are given in Table IV. Plotting P against Δ for one salt a smooth curve was attainable as is shown in Fig. 2. The curve for the salts examined were all decreasing with the increased concentration of the outer liquid. In each curve the value of P for $\Delta = -0.58^\circ$ was found by the method of interpolation, and this was compared with the result of the control experiment with

Fig. 2.



the same serum and the 0.90 % NaCl solution, of which Δ was also -0.58°C . See Table IV, in which it may be seen that the value of P with the isotonic NaCl solution being taken as the standard, KCl and NH_4Cl slightly increase P , while Na_2HPO_4 , K_2SO_4 , MgCl_2 , CaCl_2 and KH_2PO_4 decrease it, the first one slightly, and others rather markedly. The very remarkable effect of KH_2PO_4 may be attributed to its acidic reaction as will be discussed in the next section. In other cases, however, the effect should be attributed to the characteristic action of the salt ions.

Similar experiments were also carried out with Na_2CO_3 solution as the outer liquid. First we found that, when its concentration was higher than 0.6 %, the collodion cap became brittle and was often broken, so that the measurement failed. Then we came to use the solutions prepared by adding this salt to the 0.90 % NaCl solution in varied concentrations between 0.01 % and 0.5 %. The osmotic pressure measured with such solutions as the outer liquid was inconstant and its deviation was irregular, as may be seen in some examples given in Table V. Thus it was confirmed that the measurement was very difficult or rather impossible when the outer liquid contained Na_2CO_3 .

TABLE IV.

Set of exp.	outer liquid	Δ C°	osm. press.	P_H	P ($\Delta = -0.58$)		diff.
					interpol.	contr.	
I	0.80 % KCl	-0.36	23.57				
	1.20 %	-0.55	27.94				
	1.60 %	-0.74	26.90		27.75	27.04	+0.71
	2.00 %	-0.92	25.78				
II	0.90 % CaCl ₂	-0.40	25.84				
	1.30 %	-0.56	24.85		24.68	27.04	-2.36
	1.70 %	-0.73	23.04				
III	0.60 % MgCl ₂	-0.32	23.80				
	1.00 %	-0.51	23.50				
	1.50 %	-0.78	23.44		23.53	25.59	-2.06
	2.00 %	-1.05	23.15				
IV	0.45 % NH ₄ Cl	-0.29	26.71	6.77			
	0.85 %	-0.55	26.02	6.55			
	1.50 %	-0.95	24.82	6.58	25.94	$P_H = 25.59$ 7.10	+0.35
	2.00 %	-1.28	24.22	6.49			
V	1.30 % KH ₂ PO ₄	-0.31	22.96	5.34			
	1.70 %	-0.40	21.40	5.21			
	2.30 %	-0.53	19.84	5.10	19.48	$P_H = 26.95$ 7.10	-7.47
	2.80 %	-0.64	19.09	4.95			
VI	1.50 % Na HPO ₄	-0.46	26.98	7.72			
	2.50 %	-0.76	25.89	7.86	26.65	$P_H = 26.95$ 7.10	-0.30
	3.00 %	-0.91	24.71	7.89			
VII	1.50 % K ₂ SO ₄	-0.32	26.09				
	2.20 %	-0.54	25.32				
	2.70 %	-0.66	24.65		25.11	27.16	-2.05
	3.20 %	-0.76	24.08				

IV. Influence of the P_H value of the outer liquid.

In Tables III, IV and V, we saw that, near the neutral point, the influence of the P_H was covered by that of the concentration, while with the Na₂CO₃ solution the influence was quite uncertain. In the present series of experiments (Table VI)

TABLE V.

outer liquid	I		II	
	osm. press.	P _H	osm. press.	P _H
0.90 % NaCl + 0.01 % Na ₂ CO ₃	29.48	7.00	—	—
„ + 0.02 % „	31.04	7.09	—	—
„ + 0.05 % „	27.14	7.56	—	—
„ + 0.07 % „	28.04	7.58	—	—
„ + 0.10 % „	31.27	8.49	27.57	8.45
„ + 0.15 % „	—	—	27.40	8.62
„ + 0.15 % „	—	—	27.42	—
„ + 0.20 % „	28.73	8.57	29.21	8.95
„ + 0.30 % „	—	—	28.12	9.20
„ + 0.50 % „	30.33	9.57	—	—
0.90 % NaCl (control)	29.39	6.86	26.92	—
0.90 % NaCl (control)	29.68	6.75	—	—

TABLE VI.

Outer liquid: 0.90 % NaCl solution + HCl or NaOH.

P _H of the outer liquid		protein osm. press.
before equilibrium	after equilibrium	
10	6.53	31.15
9	6.47	30.25
8	6.59	28.72
6.84	—	28.37
(NaCl alone)		
6	6.67	28.35
5	6.91	28.09
4	6.98	27.59
3	6.80	27.27

we used an outer liquid of different P_H without buffer action, namely the 0.90 % NaCl solution with a different amount of

The Colloidal Osmotic Pressure of the Blood Serum. 83

HCl or NaOH added to bring its P_H to any desired value between 3.0 and 10.0. After the osmotic equilibrium was established, the P_H of the outer liquid became almost the same in every case, as the buffer action of the serum was complete for such solutions. And yet it was seen that, when the outer liquid was alkaline before the equilibrium, the colloidal osmotic pressure augmented after the equilibrium, and when the outer liquid was acidic the pressure was reduced. When the P_H of the outer liquid lies between 6.0 and 8.0, no influence was observed. Thus it was confirmed that, in the measurement, the P_H of the salt solution used as the outer liquid should be kept at about the same P_H as that of the serum within this range.

V. Influence of diluting the serum.

The serum as well as the outer liquid (0.90 % NaCl solution) were diluted in the same proportion with distilled water, and the colloidal osmotic pressure was measured. Results are given in Table VII, in which each set of experiments was of course

TABLE VII.

dilution	Protein osmotic pressure					
	I		II		III	
	obs.	calc.	obs.	calc.	obs.	calc.
0	27.05	27.05	25.35	25.35	25.00	25.00
(original)						
5/6	19.51	22.54	—	—	—	—
2/3	16.06	18.03	—	—	12.87	16.67
1/2	10.21	13.53	12.05	12.63	10.73	12.50
5/12	6.92	11.27	—	—	—	—

carried out with the same serum. Here it may be seen that the observed pressure was much less than that calculated under the assumption that the pressure was reduced proportional to

the dilution. This suggests that, when the serum is diluted, its protein particles increase their degree of aggregation, so that its colloidal osmotic pressure is reduced more than calculated. This result coincides with that of Verney. Attention should be called to the fact that, when both the outer liquid and the inner liquid are equally diluted, the colloidal osmotic pressure of the latter is reduced, while when the former alone is diluted, the pressure is increased as was mentioned in the 3rd section. As for the reason for this fact, further researches are necessary.

*VI. The colloidal osmotic pressure of the serum
and the plasma.*

It was found from experimental results that serum showed almost the same colloidal osmotic pressure as the plasma of the same blood, the plasma being prepared by adding 0.3 or 0.5 % of an oxalate or a citrate. See Table VIII. This tells us

TABLE VIII.

Outer liquid: 0.90 % NaCl solution.

Sample	Protein osm. press.
Serum	27.07
Plasma (0.3 % Oxalate)	27.15
„ (0.5 % „)	27.31
„ (0.3 % Citrate)	27.61
„ (0.5 % „)	27.51

that the osmotic pressure due to the fibrinogen dissolving in the plasma lies within the scope of the experimental error.

CONCLUSIONS.

The colloidal osmotic pressure of the blood serum is influenced by the conditions of the outer liquid as follows:

1. When a salt solution is used as the outer liquid, the colloidal osmotic pressure of the serum is reduced with the in-

creased concentration of the salt solution.

2. In isotonic solution, KCl and NH_4Cl give a higher colloidal osmotic pressure than NaCl; while Na_2HPO_4 , K_2SO_4 , MgCl_2 , CaCl_2 , and KH_2PO_4 give a lower one.

3. When the outer liquid contains Na_2CO_3 , it is impossible to carry out the measurement with the collodion membrane.

4. The acidity of the outer liquid reduces the pressure, while the alkalinity increases it. In order to obtain the natural value of the pressure, the reaction of the outer liquid should be about the same as that of the inner liquid.

5. When the serum is diluted with distilled water, its colloidal osmotic pressure is reduced.

6. The blood serum shows the same colloidal osmotic pressure as that of the plasma from the same blood.

The expense of this research was largely defrayed by the Governmental Grant for Researches in Natural Science.

REFERENCES.

- Cohnstein (1896): Pflüger's Arch. **63**, 587.
Lillie, R. S. (1907): Americ. Journ. of Physiol. **20**, 127.
Moore, B. and Parker, W. H. (1902): Americ. Journ. of Physiol. **7** 261.
Moore, B. and Roaf, H. E. (1913): Kolloidzeitschr. **13**, 133.
Oker-Blom, M. (1904): Skand. Arch. f. Physiol. **15**, 114.
Reid, E. W. (1904): Journ. of Physiol. **31**, 438.
Roth, W. (1899): Arch. f. (Anat. u.) Physiol. 417.
Sörensen, S. P. L. (1917): C. R. Lab. de Carlsb. **12**, 266.
Starling, E. H. (1896): Journ. of Physiol. **19**, 312 and **24**, 317.
Verney, E. B. (1926): Journ. of Physiol. **61**, 319.

ON THE RESTITUTION OF THE BLOOD FLUID AFTER HAEMORRHAGE.

(Studies on the Colloidal Osmotic Pressure of the
Blood Fluid. II.)

By

KŌZŌ HIROTA.

*(From the Institute of Physiology, Kyoto Imperial University.
Performed under the direction of Prof. R. Shoji.)*

(Received for publication, January 28, 1928.)

INTRODUCTION.

According to Bayliss-Starling's theory of lymph production (see Bayliss's monograph), the osmotic pressure of proteins in the plasma, to which protein the capillary vessels are regarded as impermeable, plays an important part. This pressure attracts the water with crystalloid solutes from the tissue fluid into the blood. The tissue fluid has also a colloidal osmotic pressure acting to oppose the former, but it is only about a half as strong as the former. Thus the difference of these two is the effective osmotic pressure of the blood fluid which causes absorption of water into the vessels. On the other hand the blood pressure acts to transfer water from the blood into the tissue fluid through the capillary wall. These two processes counter-act each other. When the latter exceeds the former, there takes place a lymph flow. On the contrary, when the blood pressure is lowered, e. g. by bleeding, the absorption of water from the tissue fluid into the blood is the result, and thus the blood volume as well as the blood pressure are restored.

From this point of view, Bayliss examined various solutions that have been used for transfusion into the blood vessels; for the purpose of restoring the blood volume, and he came to the conclusion that no solution containing salts alone is able to

remain in the circulation, so that the rise of blood pressure and the increase of blood volume are only transitory, as the colloidal osmotic pressure of the blood fluid is lowered by dilution of the blood fluid with such a solution. He supposed that the colloidal osmotic pressure of the blood fluid would not be restored by the natural process, and therefore he recommended the addition of 6% gum arabic into the salt solution used for this purpose, in order to give it a colloidal osmotic pressure like that of the blood fluid. His investigations were performed, however, during the war for the purpose of finding out a better method of treatment for acute haemorrhage and wound shocks in military surgery, so that he measured the blood pressure, but neither the amount of the fluid restored in the vessels, nor the colloidal osmotic pressure of the blood fluid, and thus his conclusions require further confirmation by more detailed experiments on these points.

This problem was taken up by us, and as the first of the investigations the restitution process after haemorrhage was studied on the blood pressure, on the blood volume and on the colloidal osmotic pressure of the blood fluid.

METHODS.

Rabbits were used as the subject without anaesthesia. The animal was fixed on a board and one carotid artery was connected with a Hg-manometer to record the blood pressure. When the animal attained a stable state of its blood pressure after the operation, a certain amount of the blood was taken out from the same artery. The bleeding was repeated three times each after a certain time-interval (about 0.5-3 hours). Observation were taken as follows:

1. Before the first bleeding the blood pressure was observed and confirmed that it gave almost a constant value for about one hour. This is given in the table as the initial pressure. Then the first bleeding was performed, and the reading of the blood pressure was taken, immediately after bleeding, after 5', and later at several periods during the interval until

the next bleeding was performed. During the second interval and also after the last bleeding, the readings were taken just as in the first interval.

2. Each blood sample withdrawn at each bleeding was prevented from coagulation by adding hirudin in the proportion of 1 mg for 5 cc. of blood. Of a portion of each sample, the corpuscular volume was measured by the writer's revised centrifuge method. Suppose A be the total volume of blood in the animal body, m_1 , m_2 and m_3 the amount of the blood taken out at the first, second and third bleeding respectively, and c_1 , c_2 and c_3 the corpuscular volume percentage of these samples respectively, and x_1 and x_2 the amount of water transferred from the tissue fluid into the blood during the interval between the first and second bleedings or the second and third bleedings respectively. Then we have

$$Ac_1 = (A - m_1 + x_1)c_2 + m_1c_1$$

$$\text{or} \quad x_1 = \frac{(A - m_1)(c_1 - c_2)}{c_2}$$

$$\text{and similarly} \quad x_2 = \frac{(A - m_1 - m_2)(c_2 - c_3)}{c_3}$$

After Meek and Gasser, we assumed that the total blood volume A of the rabbit averages 5.44 % of its body weight, which figure seems to us most reliable.

3. Of another sample of the hirudin-blood taken out at each bleeding the colloidal osmotic pressure of its plasma was measured by the method reported in the first report of this series of studies. As the outer liquid a 0.90 % NaCl solution was used in every case.

EXPERIMENTAL RESULTS.

In all nine experiments were carried out. First we will observe the results in the blood pressure, the amount of fluid absorbed into the blood and the colloidal osmotic pressure of the blood fluid separately, and then we will discuss the phenomena

considering all results together. The data observed directly from each experiment, except the blood pressure and the colloidal osmotic pressure are summarized in Table I, of which the important data will be inserted again in each part.

TABLE I.

No.	body weight Kg.	total blood cc.	blood bled						corpuscular volume		
			m ₁		m ₂		m ₃		c ₁ %	c ₂ %	c ₃ %
1	2.20	119.7	12.0	10.0	12.0	10.3	12.0	10.9	36.74	33.84	32.23
2	1.70	92.5	12.0	13.0	12.0	13.3	12.0	14.7	32.62	29.06	27.87
3	2.10	114.2	20.0	17.5	20.0	18.0	15.0	14.3	40.18	34.13	29.57
4	2.25	122.4	20.0	16.3	20.0	17.5	15.0	13.7	37.15	33.26	28.63
5	1.85	100.6	20.0	19.9	23.0	25.3	20.0	25.7	36.90	32.68	28.59
6	2.15	117.0	22.0	18.8	21.0	15.8	20.0	15.8	36.18	27.23	22.49
7	2.25	122.4	13.0	10.6	13.0	10.5	13.0	10.1	36.81	32.66	27.93
8	1.99	108.3	20.0	18.5	21.0	20.2	12.0	14.2	37.85	32.08	31.50
9	2.06	112.1	30.0	26.8	15.0	12.1	15.0	13.5	41.74	27.59	27.02

I. The blood pressure.

Results are given in Table II, in which may be seen the following:

1. The recovery of the blood pressure after the first and second bleedings takes place rapidly in the first 5 or 10 minutes, and later very slowly.

2. The recovery goes better, i. e. quicker and to a larger extent, when the amount bled is small. It goes incompletely when the bleeding is repeated.

3. The first rapid recovery from the second or third bleeding is generally independent of the length of the interval preceding the corresponding bleeding.

4. When the sum of the amount of blood bled repeatedly exceeds 50 % of the total blood volume of the animal, the animal generally dies, even when considerable intervals are put between each bleeding.

TABLE II.
Blood pressure after haemorrhage. (mm. Hg.)

No.	initial blood pressure	bleeding %	blood pressure during the interval								
			immedi- ately	5'	10'	20'	30'	40'	50'	60'	
1	109.4	m ₁ =10.0 m ₂ =10.3 m ₃ =10.9	90.8 86.9 79.0	96.7 65.0 66.0		106.4 99.0 69.0		109.0 99.0 69.0	109.0 (45') 99.0 (45') 69.0		69.0 (18')
2	71.3	m ₁ =13.0 m ₂ =13.3 m ₃ =14.7	57.7 53.8 42.0	63.5 57.7 42.0		67.4 61.6 42.0		69.4 63.5 42.0	69.4 62.6 41.0		44.0 (90')
3	130.8	m ₁ =17.5 m ₂ =18.0 m ₃ =14.3	94.7 55.7 died	101.6 59.6		108.4 65.5	110.3	63.5		59.6	60.6 (90')
4	110.3	m ₁ =16.3 m ₂ =17.5 m ₃ =13.7	79.0 83.0 67.4	94.7 85.0 63.5		106.4 84.0 62.6	104.5	85.0 59.6		85.0 38.2	
5	93.8	m ₁ =19.9 m ₂ =25.3 m ₃ =25.7	83.0 85.0 16.7	89.0 65.5		80.0 79.0 del (150')	82.1 	83.0		91.0	
6	112.3	m ₁ =18.8 m ₂ =15.8 m ₃ =15.8	67.4 42.0 34.3	80.1 60.0 38.2		83.0 60.6 30.4		92.9 61.6 died (27')		96.7 63.5	102.5 (180') 67.4 (90')
7	103.1	m ₁ =10.6 m ₂ =10.5 m ₃ =10.1	87.5 66.1 50.5	95.3 70.1 64.1	95.3 71.0	93.4 71.9 56.3	94.0 75.8 56.3	93.4 81.7	92.0 83.6	91.4 85.6	
8	97.3	m ₁ =18.5 m ₂ =20.2 m ₃ =14.2	44.6 11.4 died	54.4 9.5	60.2 17.3	67.0 27.1	71.9 38.8	77.8 44.6	81.7 48.5	81.7 60.2	
9	99.2	m ₁ =26.8 m ₂ =12.1 m ₃ =13.5	7.5 7.5 7.5	15.4 15.0 19.3	44.6 32.9	56.3 38.8 died	66.1 40.7	68.0 42.7	71.9 44.6	70.0 44.6	

II. Restoration of the blood volume.

After the animal is bled, the watery fluid is absorbed spontaneously from the tissue space into the blood vessel, so that the blood volume is restored to a certain extent. x_1 and x_2 calculated as mentioned above indicate this amount. Their values are given in Table III. In this table is also given the blood pressure shown immediately before the second and third bleeding in percentage figures of the initial blood pressure.

TABLE III.

Restitution of the blood volume and the colloidal osmotic pressure.

No.	immediately before	total blood cc.	blood pressure %	blood volume absorbed		percentage dilution %	colloidal osmotic pressure	
				cc.	%		cm. H ₂ O	%
1	1st bleeding	119.7	100.0			100.0	22.97	100.0
	2nd "		99.6	$x_1 = 9.2$	76.6	88.1	22.94	99.9
	3rd "		90.5	$x_2 = 5.2$	43.3	81.9	22.99	100.1
2	1st "	92.5	100.0			100.0	25.99	100.0
	2nd "		97.3	$x_1 = 9.9$	82.5	84.6	25.34	97.5
	3rd "		87.8	$x_2 = 8.3$	27.5	80.0	25.03	96.3
3	1st "	114.2	100.0			100.0	24.59	100.0
	2nd "		84.1	$x_1 = 16.7$	83.5	77.1	23.58	96.0
	3rd "		45.6	$x_2 = 14.0$	70.5	62.5	21.03	85.6
4	1st "	122.4	100.0			100.0	25.69	100.0
	2nd "		94.3	$x_1 = 12.0$	60.0	84.3	21.28	82.8
	3rd "		77.1	$x_2 = 15.3$	76.5	69.5	20.73	80.7
5	1st "	100.6	100.0			100.0	28.58	100.0
	2nd "		105.1	$x_1 = 10.4$	52.0	83.0	24.54	85.9
	3rd "		87.5	$x_2 = 9.7$	42.2	68.5	20.24	70.9
6	1st "	117.0	100.0			100.0	24.15	100.0
	2nd "		91.3	$x_1 = 31.2$	142.0	66.0	21.18	87.7
	3rd "		61.8	$x_2 = 21.7$	103.5	51.5	18.77	77.7
7	1st "	122.4	100.0			100.0	23.97	100.0
	2nd "		88.7	$x_1 = 13.9$	107.0	83.3	24.71	103.0
	3rd "		83.0	$x_2 = 18.4$	141.5	66.7	21.54	89.9
8	1st "	108.3	100.0			100.0	26.54	100.0
	2nd "		84.0	$x_1 = 15.9$	74.5	77.5	22.22	83.7
	3rd "		61.9	$x_2 = 1.5$	7.1	75.7	21.65	81.6
9	1st "	112.1	100.0			100.0	24.46	100.0
	2nd "		70.6	$x_1 = 42.1$	140.0	53.2	19.36	79.1
	3rd "		45.0	$x_2 = 2.3$	15.3	51.7	15.97	65.3

This will give an idea of the recovery of the blood pressure after the first and second bleedings. The results are summarized as follows:

1. The restoration of the blood volume after the first bleeding is fairly sufficient. When the amount of the blood bled does not exceed 30 % of the total blood volume, the amount restored is in every case more than half of the amount bled. This amount of restoration is independent of the duration of the interval (examined from 30' to 3°), so that it is very probable that the maximal restoration is attained generally within half an hour after bleeding. The recovery of the blood pressure does not go hand in hand with the restoration of the blood volume.

2. The restoration after the second bleeding is naturally less sufficient than the former. The amount restored reaches in most cases about 30 % of the amount bled. The time relation as well as the relation with the recovery of the blood pressure is the same as in the former case.

3. Generally speaking, there may be seen a tendency for the total amount of restored blood volume in repeated bleedings to increase with the increased total amount of the blood bled. But, the recovery of the blood pressure does not go parallel with the restoration of the blood volume.

III. Change in the colloidal osmotic pressure of the blood fluid after haemorrhage.

If we suppose that the restoration of the blood volume is performed by water with crystalloid solutes only, which is transferred from the tissue fluid into the blood through the capillary walls, the protein and other colloids should be diluted by this transference, and consequently the colloidal osmotic pressure of the blood plasma should be lowered by the same percentage as that by which the plasma is diluted, so far as the colloidal state of the proteins remains unchanged by dilution. Therefore the percentage dilution of the blood plasma

by restoration of the blood volume is necessary when discussing the meaning of the experimental results. We will use the term, "percentage dilution" as follows. For example, if 80 cc. of the plasma is diluted with 20 c.c. of solution, or if 100 cc. of the former has 25 cc. of the latter added to it, we will say that the dilution is 80 %. The percentage dilutions after the first and the second bleedings, Y_1 and Y_2 respectively, are calculated by the following equations.

$$\frac{Y_1}{100} = 1 - \frac{x_1}{(A - m_1 + x_1) \left(1 - \frac{c_2}{100}\right)}$$

$$\text{or} \quad = 1 - \frac{x_1}{(A - m_1) \left(1 - \frac{c_1}{100}\right) + x_1}$$

$$\text{and} \quad \frac{Y_2}{100} = 1 - \frac{x_1 - m_2 \left(1 - \frac{c_2}{100}\right) \left(1 - \frac{x_1}{100}\right) + x_2}{(A - m_1 + x_1) \left(1 - \frac{c_2}{100}\right) - m_2 \left(1 - \frac{c_2}{100}\right) + x_2}$$

$$\text{or} \quad = 1 - \frac{x_1 - m_2 \left(1 - \frac{c_2}{100}\right) \left(1 - \frac{x_1}{100}\right) + x_2}{(A - m_1 + x_1 - m_2 + x_2) \left(1 - \frac{c_3}{100}\right)}$$

Table III gives the blood pressure, the percentage dilution of the plasma and the colloidal osmotic pressure of the plasma immediately before the first, second and third bleedings. It is a matter of course that, referring to the last one, the values are those estimated with the blood samples withdrawn by the first, second and third bleedings respectively.

Contrary to the assumption made in the above calculation, we found that the colloidal osmotic pressure of the plasma was lowered more than was due to its being diluted. This was already proved in the cases of dilution with water (1st report of this series). In the present investigation the fact was confirmed to be true even when the plasma was diluted with the

isotonic saline solution. In the experiments the plasma was diluted to an extent that might occur in the animal body in our present experiments, namely 90 %, 80 % and 70 %. The results are given in Table IV.

TABLE IV.

The colloidal osmotic pressure of the diluted serum. (cm. H₂O)

No.	original serum	serum diluted to		
		90 %	80 %	70 %
1 {	cm. H ₂ O	28.12	25.10	19.03
	%	100.0	89.3	67.7
2 {	cm. H ₂ O	27.26	23.70	18.58
	%	100.0	86.3	67.7
Mean %		100.0	87.8	67.7
				57.3

This fact being taken into consideration, the following conclusions can be deduced from the results in Table III.

1. The colloidal osmotic pressure of the blood plasma measured is in every case higher than that which it should have on being diluted by the restoration of the blood amount. That is to say, the colloidal osmotic pressure was actively restored though not completely, after haemorrhage.

2. This restitution of the colloidal osmotic pressure is generally completed within 30' after hamorrhage, and a further duration of the interval does not augment it.

3. Considering the recovery of the blood pressure, of the blood volume and of the colloidal osmotic pressure after the first bleeding, it may generally be seen that, when the recovery of the blood pressure is good and that of the colloidal osmotic pressure is rather inferior, the restoration of the blood volume is slight (e.g., Nos. 4 and 5). When the recovery of the colloidal osmotic pressure is superior to that of the blood pressure, the restoration of the blood volume is marked. (e.g. Nos. 3 and 7). In No. 9, we see that the restoration of the latter is very

marked as the blood pressure is very low, even when the restitution of the colloidal osmotic pressure is also insufficient. In Nos. 1 and 2, the recoveries of both pressures are sufficient, while in No. 8 both are insufficient, and in all these cases the restoration of the blood volume is moderate. This fact offers a good proof for Bayliss-Starling's theory of lymph production. No. 6 is the only exception to this general rule. This relation is not so remarkable in the recovery process after the second bleeding. This is natural, as the tissue fluid was already diminished by the previous restoration.

IV. How the colloidal osmotic pressure is restored ?

In the above section we saw that the colloidal osmotic pressure of the blood plasma is restored to a certain extent after haemorrhage. The factors which may cause this restitution are discussed as follows:

1. It might be supposed that the capillary wall is partially permeable to lymph protein, and this protein is transferred into the blood. That this supposition is mistaken is easily proved. If the capillary wall be permeable to some kinds of proteins, they would equally be distributed between the blood and tissue fluid, so that their concentration would be the same in both media, and no mechanism is allowed to be supposed, by which these penetrating proteins transfer from the tissue fluid into the blood to a greater extent than their solvent, the watery component of the latter fluid, does unless such proteins be newly produced by the tissue cells. There is no evidence, however, for accepting such production of penetrating proteins by the tissue cells in general.

2. Next, there is a possibility that the colloidal osmotic pressure is restored by the action of some special organ. Our first attention was directed to the liver, as this organ is the largest and has the most complicated functions, and, moreover, here the lymph production takes place most intensively. In order to elucidate this question, however, the restitution of the

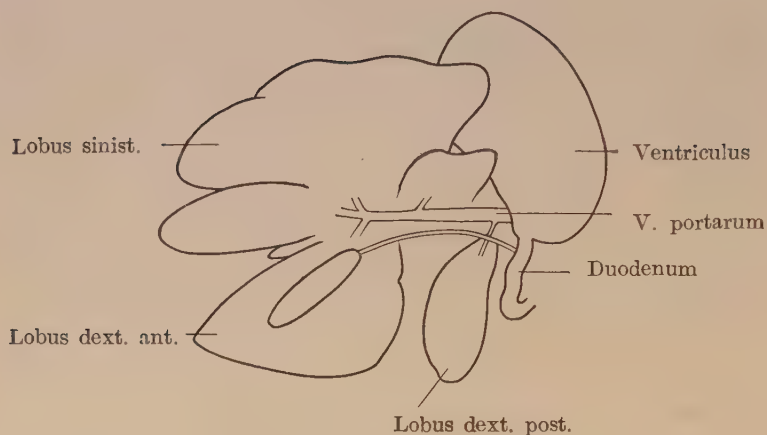
colloidal osmotic pressure should be examined after the liver is excluded from the general circulation. In order to do so, first, we ligated the portal vein, but we saw that then the animal suffered from congestion in the abdominal intestines and died soon. Establishment of anastomosis between portal vein and vena cava was proved abortive with rabbits. In this animal the liver is divided into four lobes, among which the lobus dexter posterior situated isolated from other parts, with a weight about $\frac{1}{5}$ of that of the whole liver (see the figure and Table V). And, to make the matter more convenient, the branch

TABLE V.
Weight of Lobus dext. post. of the liver.

No.	body weight Kg.	weight of liver gm.	weight of Lobus dext. post.	
			gm.	%
1	2.325	61.4	14.5	23.6
2	2.40	69.1	10.7	15.3
3	2.21	67.6	9.7	14.3
4	2.25	53.9	12.0	22.3
5	1.99	49.9	10.5	21.1
6	2.06	49.1	8.9	18.1
7	2.78	63.3	13.3	21.0
8	2.48	59.2	10.8	18.3
9	1.99	55.4	11.0	19.9
Mean			19.3	

Nos. 1, 2 and 3 correspond to Nos. 1, 2 and 3 of
Tables VI, VII, and VIII.

of the portal vein leading to this lobe is at a distance from the rest of this vein, so that by ligating the latter it is possible to obstruct the circulation of the main portion of the liver, that of the above-mentioned lobe alone being preserved. By this method the function of the liver may be excluded for the most part, even when the remaining lobe might offer compensation to some extent. We carried out three experiments.



First, the main part of the liver was excluded from the general circulation as described above. Now the first bleeding was performed and 50 or 60 minutes were allowed to pass for the setting in of the recovery process, while the blood pressure was observed. Then the second bleeding was applied and 20 - 40 minutes were again allowed to pass. In one case (No. 1) the animal died about 10 minutes after the second bleeding. Then, in the other two cases, the ligature was released to restore the hepatic circulation, and the blood pressure was watched for about one hour, and then the third bleeding was performed. In both cases the animal died soon after this last bleeding. The results of these three experiments are given in Table VI, VII and VIII. In them the following facts are observed.

(a) When the main portion of the liver was excluded from general circulation, the recovery of the blood pressure after haemorrhage was attained to a less extent than with the intact circulation. When the ligature was released, the blood pressure once fell markedly so that the life of the subject was temporarily in danger. This may be understood as the effect of the blood vessels of the liver, which had been paralysed by the obstructed circulation, accumulating a large amount of blood. Accompanied by the recovery of the vascular tonus of the liver,

TABLE VI.
Portal vein is ligatured.

No.	body weight Kg.	total blood cc.	blood fled						corpuseular volume		
			m ₁		m ₂		m ₃		c ₁	c ₂	c ₃
			cc.	%	cc.	%	cc.	%	%	%	%
1	2.325	126.5	13.0	10.3	13.0	12.0			37.34	39.39	
2	2.40	130.6	15.0	11.5	16.0	13.7	15.0	11.7	33.72	33.34	26.28
3	2.21	120.3	13.0	10.8	12.0	11.1	9.0	8.6	40.59	40.34	36.77

m₃ and c₃: Recorded after the ligature is released.

No. 1: 1st bleeding was performed 60' after ligature.

No. 2: " " 20' "

No. 3: " " 120' "

and the restoration of the blood volume, the blood pressure was gradually regained. See Table VII.

(b) The restoration of the blood volume after haemorrhage was less in the animal of which the liver was excluded, than in the intact animal. After the release of the ligature, the restoration was very marked (Table VIII). This tells us that the main localisation of this restoration is in the liver.

(c) When a large portion of the liver was excluded the colloidal osmotic pressure was not only unrestored, but it was lowered further than due to its being diluted by the restoration of the blood volume (Table VIII). Its lowering was diminished (No. 3) or it was even restored (though slightly) after the hepatic circulation was regained. This result suggests to us a supposition that, under normal conditions, the proteins, or generally speaking colloidal substances which endow the blood fluid with a colloidal osmotic pressure, are continually being consumed in the body tissues, while they are continuously being supplemented from the liver. Though this supposition is not yet fully proved, there is no doubt at least that the liver has the ability to regulate the colloidal osmotic pressure of the blood fluid.

TABLE VII.
Blood pressure after haemorrhage. (mm. Hg.)

No.	initial blood pres- sure	bleeding %	Blood pressure during the interval							
			immedi- ately	5'	10'	20'	30'	40'	50'	60'
1	75.8	$m_1 = 10.3$	48.5	53.3	54.4	50.5	46.6	44.6	36.8	
		$m_2 = 12.0$	15.4	died						
			38.8	64.1	70.0	70.0	70.0	68.0	62.2	60.2
2	71.9	$m_1 = 11.5$	9.5	23.2	32.9	38.8	50.5	50.5		
		$m_2 = 13.7$	19.3	9.5	5.5	27.1	34.1	40.7	38.0	34.9
		ligature released $m_3 = 11.7$	died							32.9 (65')
3	68.0	$m_1 = 10.8$	44.6	62.2	62.2	60.2	56.3	56.3	48.5	48.5
		$m_1 = 11.1$	13.4	19.3	23.2	27.1				
		ligature released $m_3 = 8.6$	21.2	19.3	11.4	19.3	21.2	21.2	13.4	13.4
			died							

TABLE VIII.

Restitution of the blood volume and the colloidal osmotic pressure.

No.	immediately before	total blood cc.	blood pressure %	blood volume absorbed		per-centage dilution %	colloidal osmotic pressure	
				cc.	%		cm H ₂ O	%
1	1st bleeding	126.5	100.0			100.0	24.37	100.0
	2nd „	108.3	48.4	$x_1 = -5.2$	-40.0	$y_1 = 107.9$	19.38	79.5
2	1st „	130.6	100.0			100.0	26.70	100.0
	2nd „	116.9	83.7	$x_1 = 1.3$	8.7	$y_1 = 98.2$	23.89	89.5
	3rd „	128.0	45.8	$x_2 = 27.1$	169.2	$y_2 = 70.1$	19.41	72.7
3	1st „	120.3	100.0			100.0	26.90	100.0
	2nd „	107.9	71.3	$x_1 = 0.6$	4.6	$y_1 = 99.1$	22.88	85.1
	3rd „	105.2	19.7	$x_2 = 9.3$	77.5	$y_2 = 85.3$	20.20	75.1

Ligature was released between the 2nd and 3rd bleeding.

CONCLUSIONS.

1. When a rabbit was bled to 50 % of its total blood amount the animal dies, even when the bleeding is carried out in several stages with intervals of a few hours.

2. When the amount of the blood bled was less than 30 % of the total blood, more than 50 % of this amount is restored from the tissue fluid. This amount of restoration goes not necessarily parallel with the recovery of the blood pressure. A great part of this restoration is performed in the liver.

3. The colloidal osmotic pressure of the blood plasma was actively augmented to cancel, though not completely, its lowering due to the dilution of the plasma by the restoration of the blood volume. This regulation of the colloidal osmotic pressure is mainly performed by the liver.

4. The relationship of the restitution of the blood pressure to that of the colloidal osmotic pressure and that of the blood volume shows a good accordance with Bayliss-Starling's theory of lymph production. When the blood pressure is high

and the colloidal osmotic pressure is low, the restoration of the blood volume is slight. When the former two go vice-versa, the latter is marked.

REFERENCES.

- Bayliss, W. M. (1920): Principles of General Physiology. 3rd Ed. p. 166.
Bayliss, W. M. (1919): Reports of the special investigation committee on surgical shock and allied conditions. No I, 1919.
Hirota, K. (1926): Journ. of Biophysics **1**, 233.

ON THE EMPIRICAL EQUATION FOR GELATION VELOCITY.

(Studies on Coagulation. II.)

By

KŌZŌ HIROTA.

(From the Institute of Physiology, Kyoto Imperial University.
Performed under the direction of Prof. R. Shoji.)

(Received for publication, January 28, 1928.)

INTRODUCTION.

It was reported by Shoji (I report of this series) that the increment of the viscosity of gelatin sol, $\eta - \eta_i$, in the early period of gelatinisation, was expressed by an empirical equation.

$$-\frac{d}{dt}[\lambda - (\eta - \eta_i)] = \frac{\mu}{\lambda^2}[\lambda - (\eta - \eta_i)]^2 \dots\dots\dots(1)$$

i.e.
$$\eta - \eta_i = \frac{\mu t}{1 + \frac{\mu}{\lambda} t} \dots\dots\dots(2)$$

where $\mu = \left(\frac{d\eta}{dt}\right)_{t=0}$ and $\lambda = (\eta - \eta_i)_{t=\infty}$.

The aim of the present research is to confirm this empirical equation for gelatin and agar-agar sol of varied concentrations, and also to elucidate whether these constants μ and λ be functions of the concentration.

EXPERIMENTS WITH GELATIN.

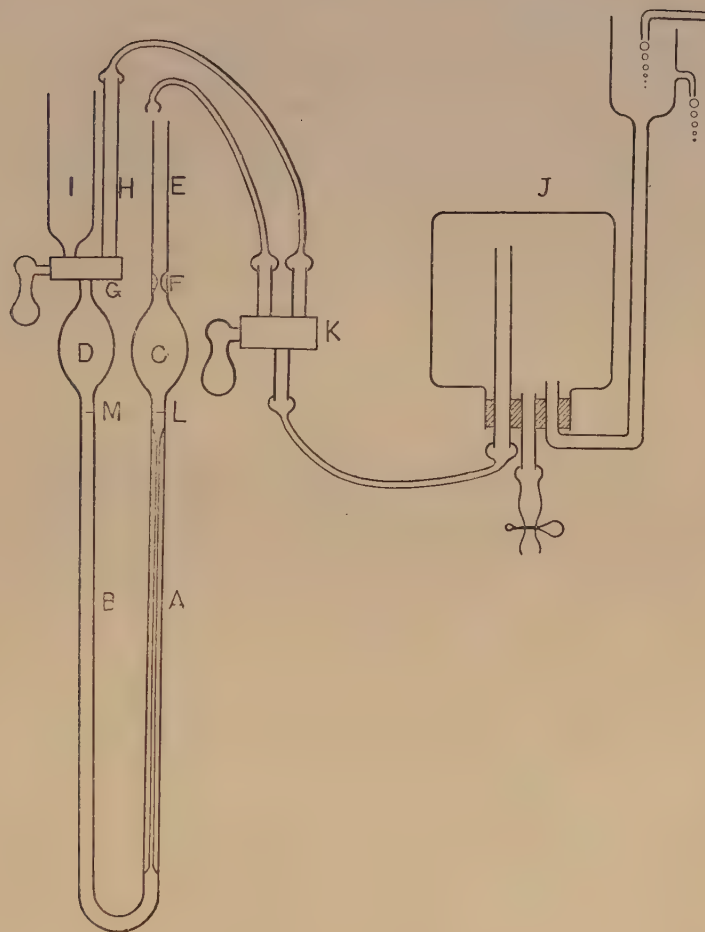
The material used was powdered gelatin made by Merck, which was more suitable for the experiment than the gelatin foil, used by Shoji, as it was more easily soluble, and the sol could be prepared every time under the same conditions. A weighed amount of the material was immersed in a desired quantity of water, warmed in a thermostat of 60° C for 2.5

minutes, the vessel being shaken uniformly, and evaporation prevented. A measured quantity of the homogeneous sol thus prepared was cooled in another thermostat of 20°C for 1.5 minutes and then it was put in a viscosimeter and the measurements were carried out at various intervals. These conditions of previous treatment were similarly maintained for every measurement.

In Shoji's experiment, the Ostward viscosimeter was used, in which the driving force for the sol was gradually diminishing during one measurement. In the present experiments, the sol was driven through the viscosimeter capillary by a constant pressure. For this purpose the viscosimeter was modified as sketched in Fig. 1. *A* is the capillary part of the viscosimeter and *B* the ordinary tubing. The bulb *C* is attached to a tube *E* with a narrow part *F*. The bulb *D* is sealed to a tap *G* at the same level as the mark *F* of the other bulb. The tap *G* has two branches upwards, i.e. the branch *H* which has a bore similar to *E*, and another one *I* which serves as a funnel. The branches *E* and *H* are connected to the constant pressure arrangement *J* through a three way tap *K* as sketched in the figure, by means of which tap the pressure can be applied either to *E* or to *H* at will, while the other branch is left opened, this being attained by disconnecting the rubber tubing from the branch.

Now a suitable quantity of the sol ready for measurement is put in the funnel *I*, and releasing the tap *G*, the viscosimeter tube (*A*, *B*, *C*, *D*,) is filled with it exactly to the mark *L* which lies between *A* and *C*, and then the tap is turned to connect *D* to *H*, which is already connected to the constant pressure. Now the sol is driven by the pressure to lower the level in *D* and raise it in *C*, until the level in *D* comes down to the mark *M* which lies at the same niveau as *L*, when the level in *C* comes to the mark *F*. The time necessary for the moving of the level in *C* from *L* to *F* is measured by means of a stopwatch. Then the driving pressure is applied to *E*, *H* being released from it

Fig. 1.



and left open, and again the time necessary for the coming down of the level from *F* to *L* is measured. The mean of these two measurements is taken, from which the relative viscosity is calculated as usual.

In the present experiments measurement was carried out every 6 minutes till one hour from the beginning of gelation,

and later every 20 minutes. Results with sols of 2.5—5.0 % are given in Protocol I.

COMPUTATION OF η_i AND CONFIRMATION OF EQUATION (2).

Shoji computed the η_i -value by graphical extrapolation. In order to obtain its most probable value, however, we compute it by the following mathematical treatment. Putting in equation (2)

$$\frac{1}{\eta - \eta_i} = y, \quad \frac{1}{\lambda} = a, \quad \frac{1}{\mu} = b, \quad \text{and} \quad \frac{1}{t} = T,$$

the equation becomes

$$y = a + bT.$$

First, the value of η_i computed graphically being applied in the equation, and n observation equations are obtained, i.e.

$$\left. \begin{aligned} y_1 &= a + bT_1 \\ y_2 &= a + bT_2 \\ &\dots\dots\dots \\ y_n &= a + bT_n \end{aligned} \right\} \dots\dots\dots (3)$$

for n observations in one experiment. Assuming equal weight for each of them, the values of a and b are computed by the method of least squares. The values of a and b thus computed are applied again to equation series (3) and n values of η_i are obtainable, of which the mean value is more probable than that obtained by the graphical method. This more probable value of η_i is again applied to equation series (3) and again n observation equations are obtained, from which the still more probable value of η_i is obtainable by repetition of the same treatment. This mathematical procedure is repeated until the mean value of η_i is unchanged by further repetition of the procedure. This is the most probable value of η_i , with which n observation equations with their weight are computed as follows.

$$\left. \begin{array}{l} y_1 = a + bT_1 \text{ with weight } (\eta - \eta_i)_1^4 \\ y_2 = a + bT_2 \text{ ,, ,, } (\eta - \eta_i)_2^4 \\ \dots\dots\dots \\ y_n = a + bT_n \text{ ,, ,, } (\eta - \eta_i)_n^4 \end{array} \right\} \dots\dots\dots (4)$$

From these equations the most probable values of a and b are computed by the method of least squares, and then the values of the constants λ and μ are calculated, which are given in Protocol I. The calculated values of $\eta - \eta_i$ given in the protocol are those calculated by equation (2) with the values of λ and μ thus calculated. The coincidence of them with the observed values is quite satisfactory, so that the applicability of equation (2) is confirmed. Fig. 2 shows some of the $(\eta - \eta_i) - t$ curves observed.

λ AND μ AS FUNCTIONS OF THE CONCENTRATION OF GELATIN.

The constants λ and μ computed as described above are summarized in Table I. Here we see that the critical concen-

Fig. 2.

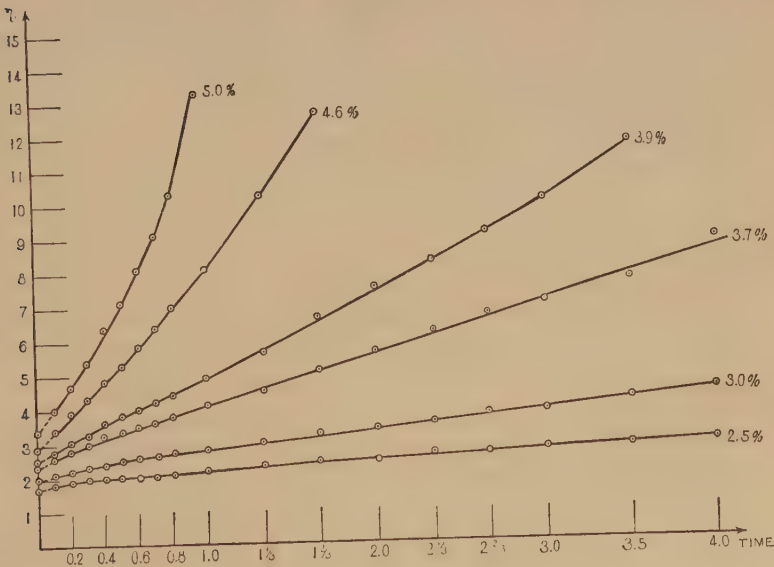


TABLE I.

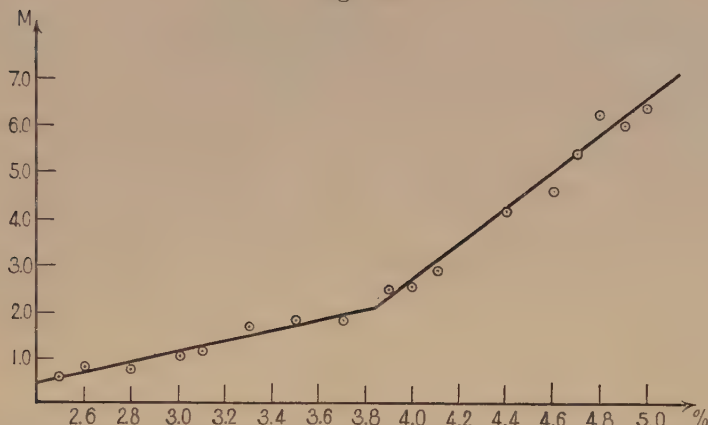
%	λ	μ
2.5	2.239	0.5900
2.6	1.983	0.8108
2.8	4.533	0.6548
3.0	4.200	0.9974
3.1	6.382	1.071
3.3	4.985	1.635
3.5	10.83	1.778
3.7	44.24	1.777
3.9	-101.0	2.357
4.0	- 54.95	2.441
4.1	- 50.76	2.745
4.4	- 86.21	4.028
4.6	- 33.11	4.525
4.7	- 26.39	5.271
4.8	- 54.05	6.184
4.9	- 18.48	5.963
5.0	- 17.76	6.293

tration where $\lambda = \infty$ lies between 3.7% and 3.9% with our material. Below this critical concentration, λ is an increasing function of the concentration of gelatin and the rate of increase again increases with the concentration, though its functional form can not be settled.

The constant μ is an increasing function of the concentration. Plotting the data, we obtain two straight lines which cut each other at the critical concentration mentioned above, namely, at about 3.8% (see Fig. 3). Below this concentration the slope of the line is less than that for the higher concentration.

These results suggest to us that there is some quantitative difference in the mechanism of the gelation of a dilute and of a concentrated sol of gelatin, the limiting concentration of these two classes being 3.8 % with our material, though in its nature

Fig. 3.



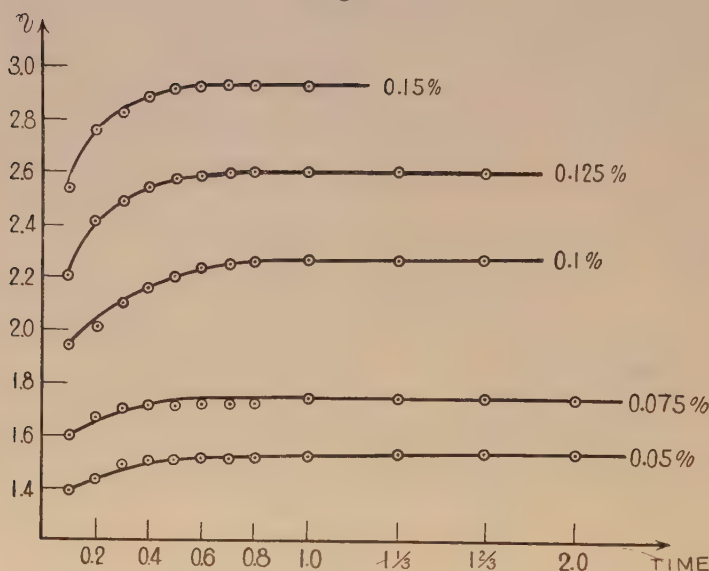
the process of gelation is uniform, as it may be represented by one and the same form of empirical formula.

GELATION OF AGAR-AGAR SOL.

Similar experiments were carried out with agar-agar. The material used was powdered agar-agar made by Kahlbaum. The mixture of the material with water was warmed at 98°C for one hour to prepare a sol, evaporation being prevented. Then it was cooled in a thermostat of 20°C for 4 minutes and then the viscosimetry was begun at 20°C by the same method as with gelatin. With this material the preparation of a homogeneous sol was more difficult than with gelatin, and when the sol thus prepared contained some visible solid substances, it was discarded.

The results for 0.05—0.175 % sol are tabled in Protocol II, and graphed in Fig. 4. Here we see that the viscosity increases with the time, but the rate of its increase diminishes with the time until the viscosity attains a constant and maximal value after a certain interval. Below 0.15 % this maximal viscosity is almost proportional to the concentration, while that of 0.175 % markedly exceeds the proportion. The time required by the gelation process until this maximal viscosity is attained

Fig. 4.



is reduced with the increased concentration. This gelation process of agar-agar seems to be similar to that of gelatin below the critical concentration, but in this case it is impossible to estimate the value of η_i even by graphical extrapolation, and accordingly the verification of the applicability of the empirical formula is quite beyond mathematical possibility.

When the initial heating of the sol at 98°C was continued longer, namely, for 4 or 5 hours, the maximal viscosity of the gelation was reduced as may also be seen in Protocol II, so that heating at a high temperature denaturates the gelatinising substance of agar-agar, as we have already observed with gelatin.

SUMMARY.

1. The empirical formula for gelation of gelatin,

$$\eta - \eta_i = \frac{\mu t}{1 + \frac{\mu}{\lambda} t}$$

On the Empirical Equation for Gelation Velocity. 111

was confirmed at different concentrations from 2.5 % to 5.0 % of Merck's powdered gelatin, and the critical concentration where $\lambda=\infty$ was found to be 3.8 %.

2. The constant μ increases with the concentration of gelatin in a linear proportionality. The rate of increase, however, is different in a more dilute and in a more concentrated sol than the critical concentration, and the former is less than the latter. Thus the gelation process is quantitatively different in these two scopes of concentration, though the nature of it is one and the same.

3. The gelation of the agar-agar sol of from 0.05 % to 0.175 % seems to belong to the class of the gelation of gelatin of lower concentrations, but the applicability of the empirical formula given above was not confirmed. The maximal viscosity attained by gelation is higher with higher concentrations of the sol. Heating of the sol at 98°C gradually denaturates the sol and reduces the maximal viscosity of gelation.

The expense of this research was partly defrayed by the Governmental Grant for Researches in Natural Science.

REFERENCE

Shoji, R. (1919): Biochem. Journ. **13**, 227.

PROTOCOL I.

t (Hour)	2.5 %		2.6 %		2.8 %		3.0 %		3.1 %		3.3 %	
	η		η		η		η		η		η	
	(obs.)	(calc.)	(obs.)	(calc.)	(obs.)	(calc.)	(obs.)	(calc.)	(obs.)	(calc.)	(obs.)	(calc.)
0	1.745	0	1.785	0	1.905	0	2.013	0	2.085	0	2.185	0
0.1	1.80	0.055	1.89	0.105	1.97	0.065	2.12	0.107	2.20	0.115	2.36	0.175
0.2	1.86	0.115	1.99	0.205	2.02	0.115	2.22	0.207	2.30	0.215	2.52	0.335
0.3	1.91	0.165	2.04	0.255	2.09	0.135	2.31	0.297	2.42	0.335	2.66	0.475
0.4	1.96	0.215	2.09	0.335	2.18	0.275	2.39	0.377	2.51	0.425	2.80	0.615
0.5	2.01	0.235	2.13	0.345	2.23	0.325	2.47	0.457	2.60	0.515	2.89	0.705
0.6	2.05	0.305	2.17	0.335	2.29	0.385	2.54	0.527	2.67	0.585	2.99	0.805
0.7	2.11	0.365	2.21	0.425	2.32	0.415	2.61	0.597	2.78	0.695	3.12	0.935
0.8	2.15	0.405	2.25	0.465	2.38	0.475	2.68	0.667	2.84	0.755	3.21	1.025
1.0	2.22	0.475	2.34	0.555	2.47	0.535	2.80	0.787	2.99	0.905	3.36	1.175
1 $\frac{1}{2}$	2.33	0.585	2.44	0.655	2.61	0.705	3.01	0.997	3.21	1.125	3.60	1.415
1 $\frac{3}{4}$	2.40	0.655	2.54	0.755	2.75	0.845	3.16	1.147	3.45	1.365	4.02	1.835
2.0	2.50	0.755	2.66	0.875	2.93	1.025	3.38	1.367	3.65	1.565	4.80	a=0.2006
2 $\frac{1}{2}$	2.61	0.865	2.78	0.995	3.03	1.155	3.53	1.517	3.93	1.845	5.11	$\lambda=4.985$
2 $\frac{3}{4}$	2.65	0.905	2.84	1.055	3.36	a=0.2206	3.73	a=0.2381	4.18	a=0.1567	5.48	b=0.6116
3.0	2.75	1.005	2.91	1.125	3.58	$\lambda=4.533$	3.85	$\lambda=4.200$	4.43	$\lambda=6.382$	5.91	$\mu=1.635$
3.5	2.80	a=0.4436	3.08	a=0.5036	3.71	b=1.5272	4.14	b=1.0026	4.75	b=0.9340	6.39	
4.0	2.92	$\lambda=1.986$	3.19	$\lambda=1.986$	3.84	$\mu=0.6548$	4.40	$\mu=0.9974$	5.07	$\mu=1.071$	7.00	
4.5	2.98	b=1.6949	3.25	b=1.2333	3.93		4.66		5.35			
5.0	3.09	$\mu=0.5900$	3.35	$\mu=0.8108$	3.93		4.85		5.60			

PROTOCOL I. (contin.).

t (Hour)	4.6 %			4.7 %			4.8 %			4.9 %			5.0 %		
	η	$\eta - \eta_i$		η	$\eta - \eta_i$		η	$\eta - \eta_i$		η	$\eta - \eta_i$		η	$\eta - \eta_i$	
		(obs.)	(calc.)		(obs.)	(calc.)		(obs.)	(calc.)		(obs.)	(calc.)		(obs.)	(calc.)
0	2.91	0	0	2.97	0	0	3.04	0	0	3.13	0	0	3.36	0	0
0.1	3.39	0.48	0.44	3.54	0.57	0.54	3.68	0.64	0.63	3.79	0.63	0.62	3.99	0.63	0.65
0.2	3.87	0.96	0.93	4.23	1.26	1.10	4.35	1.31	1.27	4.48	1.35	1.27	4.66	1.30	1.35
0.3	4.33	1.42	1.42	4.76	1.79	1.68	4.98	1.94	1.92	5.20	2.07	1.98	5.41	2.05	2.11
0.4	4.80	1.89	1.92	5.31	2.34	2.29	5.65	2.61	2.59	6.00	2.87	2.74	6.26	2.90	2.93
0.5	5.26	2.35	2.43	5.91	2.94	2.92	6.31	3.27	3.28	6.86	3.73	3.56	7.10	3.74	3.82
0.6	5.83	2.92	2.96	6.52	3.55	3.60	6.96	3.92	3.97	7.48	4.35	4.42	8.07	4.71	4.78
0.7	6.43	3.52	3.50	7.08	4.11	4.29	7.71	4.67	4.69	8.55	5.42	5.38	9.05	5.69	5.85
0.8	6.96	4.05	4.07	7.80	4.83	5.03	8.53	5.49	5.45	9.42	6.29	6.41	10.36	7.00	7.00
1.0	8.09	5.18	5.24	9.65	6.68	7.04	10.83	a = -0.0185 λ = -54.05		11.52	8.39	8.77	13.22	9.86	9.71
1 $\frac{1}{2}$	10.30	7.39	7.39	12.62	9.65	9.58	15.43	λ = -54.05		17.26	14.13	13.95	19.33	15.97	15.97
1 $\frac{3}{4}$	12.67	9.76	9.76	a = -0.0379				b = 0.1617		a = -0.0541					
				λ = -26.39				μ = 6.184		λ = -18.48					
				b = 0.1897						b = 0.1677					
				μ = 5.271						μ = 5.963					
										a = -0.0563					
										λ = -17.76					
										b = 0.1589					
										μ = 6.293					

On the Empirical Equation for Gelation Velocity. 115

PROTOCOL II.

η of agar-agar.

t	Heated at 98° C for								
	1 hour						1 h	4 h	5 h
	0.05%	0.075%	0.1%	0.125%	0.15%	0.175%	0.09%	0.09%	0.09%
0.1	1.33	1.60	1.94	2.20	2.54	4.30	1.73	1.52	1.48
0.2	1.43	1.67	2.06	2.41	2.76	5.49	1.74	1.56	1.52
0.3	1.48	1.70	2.10	2.48	2.82	6.35	1.78	1.60	1.57
0.4	1.49	1.71	2.16	2.54	2.88	6.43	1.80	1.64	1.57
0.5	1.50	1.72	2.20	2.56	2.91	6.45	1.80	1.64	1.59
0.6	1.50	1.72	2.23	2.58	2.92	6.45	1.81	1.64	1.60
0.7	1.51	1.72	2.25	2.59	2.92	6.45	1.81	1.64	1.60
0.8	1.52	1.73	2.25	2.59	2.92	6.45	1.81		1.60
1.0	1.53	1.74	2.25	2.59	2.92		1.81		1.60
1 $\frac{1}{8}$	1.54	1.74	2.25	2.59					
1 $\frac{3}{8}$	1.54	1.74							
2.0	1.54	1.74							
2 $\frac{1}{8}$	1.54								

BIOCHEMICAL STUDIES ON URIC ACID

By

TOKUSABURO SHIMODA

*(From the Biochemical Department of the Jikei-Kwai Medical College,
Tokyo. Director: Prof. Dr. T. Nagayama.)*

(Received for publication, January 30, 1928.)

I. INTRODUCTION.

Uric acid, an important end-product of metabolism, was first discovered by Scheel and Bergmann in 1776 from the urine and the stone of the urinary bladder. In the lapse of one hundred and fifty years since many scientists have studied and experimented on this substance, and literature is full of this subject, but there still remain many problems to be solved. For instance, no satisfactory explanation is yet given as to the fate of uric acid introduced into the animal body, and the synthesis and destruction of this substance in the animal organisms also. Especially is the biological significance of uric acid quite obscure. This is partly due to the lack of suitable analytical technique.

The author of this communication tried under the direction of Prof. T. Nagayama to find out the best determination of uric and its allied substances and then followed the fate of uric acid under every condition after its introduction into the animal bodies.

II. EXPERIMENTAL METHOD.

The animals used for the experiments were mostly rabbits. The reason why the author employed rabbits for the experiments lies in the fact that the blood of these animals contains only a small fraction of a milligram of uric acid per 100 cc. of blood and that their urine also excretes a very small amount of uric acid, and also that the forage of this animal is nearly free from purine bodies. It is well known that the elimination

and the distribution of uric acid are increased by an increase in the dietary intake.

In the first part of the experiment the distribution of uric acid and its allied substances in normal rabbits was determined in the urine, blood, faeces, organ and the contents of alimentary canal. The uric acid solution was then introduced by means of a stomach tube to study the fate of the introduced extra uric acid. Later, the destruction of uric acid in solutions was examined under various conditions, and the results were referred to the animal experiments.

A. The treatment and the forage of animals.

Rabbits weighing from two to three kilograms were employed, most of them males. Just as much care was taken in this case as in the studies on general metabolism in the treatment of the animal and their forage. Animals purchased from a merchant were kept under observation for about a week, fed with a standardized forage and under certain conditions. Then they were used for experiments after ascertaining that their health condition was quite normal, that the fluctuation of body weight was very narrow, and that the urine and its constituents were also of normal level by determining them occasionally.

The urine was collected every twenty-four hours and the faeces every three days; blood was taken from the ear vein (except in the case of a special experiment); the organs and the contents of alimentary canal were taken out immediately after the animal was killed. Most of the animals were killed by means of the injection of air intravenously.

The animals were fed twice a day (at 8 A. M. and 8 P. M.) with a definite amount of okara, carrot and komatsuna. The forage for a day, per kilo of body weight was as follows:—

okara,	70 gm.
carrot,	40 „
komatsuna,	50 „

The ingredients of the above mentioned forage were analysed,

as shown in Table I.

TABLE I.

	Okara	Carrot	Komatsuna
	%	%	%
Water	84.490	89.120	94.130
Ash	0.860	0.770	0.812
Nitrogen	0.672	0.376	0.218
Purine bodies	trace	0	0

According to Table I, the daily amount of the ingredients of the forage ingested by a rabbit, per kilo of body weight, was as follows:—

Water,	141.9 cc.
Ash,	1.316 gm.
Nitrogen,	0.730 ,,
Purine bodies,	a trace.

B. Urine analysis.

1. *Total nitrogen*: Micro-Kjeldahl Shimoda's Method was employed in determining the total nitrogen in the urine. If the urine to be tested contained albumin, this had to be removed before an attempt at a nitrogen estimation was made. This may be done by heating to boiling, acidifying with acetic acid to coagulate the protein, filtering and making up the filtrate to the original volume of the urine.

2. *Urea nitrogen*: by urease method.

3. *Ammonia nitrogen*: by Folin's aspiration method (Folin, 1912).

4. *Creatinine*: by Folin's method (Folin, 1914).

5. *Purine bases nitrogen*: by the method given below which is a slight modification of the method given by the Deniges (1919) which in turn is a modification of Haycraft's (1919). Haycraft's reagent is too much concentrated because the

urine of a rabbit contains a very small amount of purine bases and a drop of reagent for titration gives exceedingly different result. The author employed $n/100$ Silver nitrate solution for titration instead of $n/10$ Silver nitrate solution.

a) Principle: The method serves for the determination of both uric acid and the purine bases. The phosphates in the urine are removed by treatment with magnesia mixture. The purine bases and uric acid are then thrown down as their silver salts and the remaining silver contents in this solution is determined. This result minus the uric acid estimated by Benedict's method will give the figure for the purine bases.

b) Reagents, *Magnesia silver mixture.*

Ammonium chloride,	75, gm.
Magnesium chloride,	50, ,,
20% Ammonia water,	400, cc.
„ up to,	510, cc.
$n/10\text{AgNO}_3$ solution,	500, cc.

Dissolve 75 gm. of ammonium chloride and 50 grams of magnesium chloride in 400 cc. of 20 per cent ammonia water, and make up to about 510 cc. The mixture should be filtered through a dry filter paper. Place 500 cc. of $n/10\text{-AgNO}_3$ solution into a 1000.0 cc. volumetric flask, add the solution above mentioned and make up to the mark, then mix well by means of inversion several times. This solution is equivalent to $n/200\text{-AgNO}_3$ solution.

Transfer 25.0 cc. of silver magnesia mixture into a 250 cc. flask and add with constant stirring 100.0 cc. of the urine. Let stand for a few minutes after mixing thoroughly, and filter into another flask (100 cc. of the filtrate is equivalent to 80 cc. of the original urine). To 100 cc. of the filtrate add 10.0 cc. of $n/10\text{-KCN}$ solution and 1 cc. of newly prepared KI solution. Titrate the solution with $n/100\text{-AgNO}_3$ solution. 10 cc. of $n/10\text{-KCN}$ solution is equivalent to the AgNO_3 solution which was added at the beginning of the procedure. The amount of $n/100\text{-AgNO}_3$ solution for titration is equivalent to the AgNO_3 which combined the total purine bases.

1 cc. of $n/100\text{-AgNO}_3$ solution is equivalent to 1.68 milligrams of nitrogen of purine bodies.

The total purine bases as uric acid is calculated as follows:—

$$N \times 1.68 \times \frac{100}{89} = \text{mgs. of total purine per 100 cc. of the urine.}$$

N ...The amount of $n/100\text{-AgNO}_3$ solution for titration.

The amount of the uric acid (estimated by Benedict's method) per 100 cc. of the urine subtracted from total purine, and then multiplied by 0.333 equals the amount of the purine bases nitrogen.

$n/10\text{-AgNO}_3$ solution.

Dissolve 17.000 grams of AgNO_3 in 1000.0 cc. of distilled water.

n/10-KCN solution.

Dissolve 16-18 grams of pure potassium cyanide in 1100 cc. of distilled water, add 10 cc. of 40 per cent NaOH solution, mix well, and filter if necessary.

Transfer 10.0 cc. of this potassium cyanide solution to a beaker, and 10.0 cc. of 20 per cent ammonia water, 50 cc. of distilled water and 1 cc. of 10 per cent potassium iodide solution, then titrate with $n/10\text{-AgNO}_3$ solution, and make $n/10$ -solution.

n/100-AgNO₃ solution.

Place 10.0 cc. of $n/10$ -Silver nitrate solution into a 100.0 cc. volumetric flask and make up to the mark with distilled water, and mix well.

6. *Uric acid.* : The uric acid was determined in the urine, blood, organ, content of alimentary canal and the solution to be ingested and injected, according to the method of Benedict and Frank, using the arsenophosphotungstic acid colour reagent.

7. *Allantoine.* : Allantoine is determined by determining the urea, allantoine and performed ammonia by Benedict's urea method (see experiment 276, p. 1085 the 3rd. edition of "Physiological chemistry," Mathews), and then the urea and performed ammonia by the urease method. Benedict's method detects not only the urea nitrogen, but about 70 per cent of the allantoine nitrogen as well. The urease method detects only the urea nitrogen.

Method:—In one sample of urine, the performed ammonia is determined, by Folin's aspiration method. In another sample, the urea and allantoine are determined by Benedict's method. In a third sample the urea and performed ammonia are determined by hydrolysing the urea by urease. The difference between the combined ammonia, urea, and allantoine obtained in Benedict's method and the urease, urea, and ammonia gives the allantoine ammonia. Since this detects only about 70% of the allantoine, the result must be multiplied by 100/70 to give the amount of ammonia from the allantoine in the amount of urine taken.

C, Uric acid in blood.

Benedict's method was employed.

The protein of the blood is removed by precipitation with

25 per cent phosphoric acid meta solution instead of Folin's tungstic acid method.

Preparation of the protein free blood filtrate. : To prevent coagulation, the ratio of 20 mg. of potassium oxalate per 10 cc. of blood should have been used. Use of much larger amounts of oxalate interferes more or less with the uric acid determination. Transfer a measured quantity (1 to 3 cc.) of oxalated blood to a flask having a capacity of twenty times that of the volume taken, lake the blood with seven volumes of water. Add from a graduated pipette, very slowly (drop by drop) and with constant shaking, $\frac{3}{5}$ volume of 25 per cent. phosphoric acid meta solution. Close the mouth of the flask with a rubber stopper, and shake. Let it stand for one hour. The colour of the coagulum gradually changes from red to dark brown. If this change in colour does not occur, the coagulation is incomplete, usually because too much oxalate is present. In such an emergency the sample may be saved by adding phosphoric acid meta solution, one drop at a time shaking vigorously after each drop and continuing until there is practically no foaming and until the dark brown colour has set in. The volume of this extra added phosphoric acid solution should be corrected in calculation. Pour the mixture on a dry filter large enough to hold it all. This filtration should be begun by adding only a few cc. of the mixture down the double portion of the filter paper and withholding the remainder until the whole filter is wet. Then the whole of the mixture is poured into the funnel and covered with a watch glass. If the filtrate should be clear as water, no refiltering is necessary.

Five cc. of blood filtrate are transferred to an ordinary test tube and five cc. of water added. Into another test tube, five cc. of standard uric acid solution (containing 0.02 mg. of uric acid) are introduced and made up to 10 cc. with distilled water. To both standard and unknown are added from a burette, 4 cc. of 5 per cent sodium cyanide solution (poison!). To each tube is then added 1 cc. of arsenophosphotungstic reagent. The

contents of each tube should be mixed by inversion and placed at once in boiling water where the tubes should be left for three minutes. After heating, the tubes are removed and placed in a beaker of cold water for three minutes and compared in a colorimeter against the standard, preferably within five minutes after removing from the cold water.

Calculation: Employing the standard solution containing 0.02 mg. of uric acid and using five cc. of the 1:10 blood filtrate the calculation is as follows:—

$$\frac{\text{Reading of standard}}{\text{Reading of unknown}} \times 4 = \text{mgs. of uric acid per 100 cc. of blood.}$$

Uric acid in organs, faeces and contents of the alimentary canal are determined in the following way;—

Five grams of materials (organs and contents of alimentary canal may be used when still warm) are well ground with five grams of fine sand and five cc. 0.85 per cent. sodium chloride solution. The mixture is transferred into a 200 cc. flask, graduated at 100 cc., made up to 100 cc. with 0.85 per cent. physiological salt solution, thoroughly shaken, and the mixture then filtered through clean cloth. Then five cc. of the filtrate is transferred to a test tube with a pipette, and the total protein is removed by precipitation, and analysed for the uric acid, just as in the processes of blood analysis. According to the uric acid concentrations expected in the materials, the degree of dilution is sometimes modified, the mixture being made up to 50 or 500 cc. When large doses of uric acid are ingested into the animals, the contents of alimentary canals, for uric acid determination are extracted with 0.28 per cent. lithium carbonate solution, and heated exactly five minutes in a water bath at 100 C. instead of cold extraction with physiological salt solution.

Non-protein nitrogen in the blood and the contents of the alimentary canal are determined with the filtrate above mentioned. by the Micro-Kjeldahl Method.

III. EXCRETION AND DISTRIBUTION OF URIC ACID IN NORMAL RABBITS.

A. *Excretion of uric acid and other nitrogenous cleavage products in the urine.*

Six rabbits were used in this experiment.

The urine was collected accurately by means of catheterization every twenty four hours for six days, and the following were determined;—volume, specific gravity, reaction and the ingredients of the urine.

The result is shown in Table II.

TABLE II.

No.	Volume	Specific gravity	Reaction	Total-N	Urea-N	Ammonia N	Creatinine	Purine bases N.	Uric acid	Allantoin nitrogen
	cc.			gm.	gm.	gm.	gm.	mg.	mg.	mg.
1	328	1.014	alk.	2.102	1.547	0.013	0.129	2.009	13.269	0.206
2	280	1.013	„	1.869	1.475	0.016	0.111	3.383	12.227	0.247
3	243	1.018	„	1.893	1.537	0.016	0.087	4.402	12.469	0.321
4	285	1.018	„	1.828	1.499	0.013	0.083	4.175	13.334	0.239
5	271	1.014	„	1.769	1.399	0.018	0.079	2.174	8.434	0.275
6	293	1.013	„	2.006	1.563	0.019	0.104	2.710	12.784	0.256
Average	283	1.015	alk.	1.911	1.503	0.016	0.100	3.142	12.092	0.257

The excretion of uric acid in the urine for twenty four hours differs from 7.013 to 18.132 mg. and the average was 12.092 mg. but the individual variation was much less in each case. The excretion of purine bases and allantoin was quite small in amount, the former averaging 3.152 mg. per day and the latter 0.257 mg.

B. *Excretion of uric acid in the faeces.*

Four cases were used in this experiment.

A rabbit, fed in a cage, excretes faeces very irregularly,

therefore, it takes a longer time to arrive at the accurate amount of faeces excreted. Therefore, faeces was collected every three days for fifteen days, and the amount of uric acid was estimated in every specimen.

The result is shown in Table III.

TABLE III.

No. of the animal	No. 7		No. 8		No. 9		No. 10	
Body weight	2400 gm.		2150 gm.		2500 gm.		2300 gm.	
Faeces	Amount	Uric acid	Amount	Uric acid	Amount	Uric acid	Amount	Uric acid
Date	gm.	mg.	mg.	mg.	gm.	mg.	gm.	mg.
1st. 3 days	35.0	1.761	28.0	1.504	28.0	1.607	35.0	1.792
2nd. "	27.0	1.677	2.8	0.176	15.0	1.203	26.0	1.479
3rd. "	54.0	2.765	32.0	1.834	40.0	2.052	3.4	0.303
4th. "	2.7	0.241	45.0	2.259	5.7	0.482	17.0	1.491
5th. "	18.0	1.463	4.0	0.321	20.5	1.296	43.0	2.636
Total	137.1	7.907	111.8	6.094	109.5	6.640	124.4	7.691
Average per day	9.1	0.527	7.4	0.406	7.3	0.443	8.3	0.511

The amount of faeces excreted varied from 7.3 to 9.1 gm. and the average was 8.0 gm. per day. The smallest amount of uric acid in the faeces was 0.406 mg. and the largest 0.527 mg. and the average was 0.472 mg. per day.

C. The uric acid in the blood,

Eight cases were used in this experiment.

The blood was withdrawn from the marginal vein of the ear in all cases, at eight o'clock in the morning before feeding;

then the blood was taken in the first two cases respectively at 9, 10, 11, 12, A.M. and 1. P.M., in the second two cases at 2, 3, 4, 5, 6, and 7, P.M., in the third two cases at 8, 9, 10, 11, 12, P.M. and 1, A.M. and in the last two cases at 2, 3, 4, 5, 6, and 7, A.M.

The uric acid and non-protein nitrogen in all specimens were determined.

The result is shown in Table IV, and V,

TABLE IV.

No. of the animal	No. 11	No. 13	No. 16	No. 17	No. 18	No. 19	No. 20	No. 21	Ave.
Body Weight (gm.)	2750	2130	2480	2500	2310	3000	2300	2500	2483
Uric acid $\frac{\text{mg. per}}{100 \text{ cc.}}$	0.772	1.028	0.918	0.932	0.732	0.852	0.892	0.868	0.878
Non-protein Nitrogen "	38.32	41.24	39.10	38.12	37.89	40.14	37.33	39.48	38.95

The individual variation of uric acid and non-protein nitrogen in the blood per 100 cc. of the former was from 0.732 mg. to 1.028 mg. and the average, 0.878 mg. and in the latter it would vary from 37.38 mg. to 41.25 mg. with an average of 38.95 mg. The daily variation was from 0.713 mg. to 1.061 mg. with an average of 0.903 mg. in the uric acid, and from 34.76 mg. to 42.88 mg. (average 36.76 mg.) in the non-protein nitrogen.

D. Uric acid in organs.

Six cases were used for this experiment.

Organs;—liver, kidney, spleen, lung, brain, heart and muscle were taken out immediately after death, and the amount of uric acid was estimated in each organ.

The result is shown in Table VI.

TABLE V.

Amount of Non-protein N and uric acid in mg. per 100 cc. of the Blood

No. of the animal	Weight	Non-protein N	Uric acid	Non-protein N	Uric acid	Non-protein N	Uric acid	Non-protein N	Uric acid	Non-protein N	Uric acid	Non-protein N	Uric acid
		8 A.M.		9 A.M.		10 A.M.		11 A.M.		Noon.		1 P.M.	
11	2100	38.32	0.772	39.99	0.932	42.34	1.032	—	0.712	40.89	0.652	—	0.713
13	2300	41.24	1.028	33.78	0.917	43.43	—	—	0.913	—	1.012	35.34	1.038
Ave.	2200	39.78	0.900	39.38	0.924	42.88	1.032	—	0.812	40.89	0.832	35.34	0.875
		2 P.M.		3 P.M.		4 P.M.		5 P.M.		6 P.M.		7 P.M.	
16	2500	39.37	0.940	—	0.956	33.76	1.032	34.00	1.073	—	0.915	37.16	0.913
17	2130	34.34	0.941	34.76	—	—	1.017	34.32	1.051	—	0.913	37.86	0.993
Ave.	2315	36.85	0.941	34.76	0.956	36.76	1.024	34.16	1.061	—	0.914	37.51	0.953
		8 P.M.		9 P.M.		10 P.M.		11 P.M.		12 P.M.		1 A.M.	
18	2500	38.34	0.751	34.32	0.781	—	1.038	40.37	1.013	—	0.751	35.46	0.785
19	2300	38.76	0.844	34.74	0.825	—	0.881	36.32	1.071	36.36	1.121	—	0.913
Ave.	2400	38.55	0.797	34.53	0.803	—	0.959	38.34	1.042	36.36	0.936	35.46	0.849
		2 A.M.		3 A.M.		4 A.M.		5 A.M.		6 A.M.		7 A.M.	
20	2450	37.37	0.895	36.43	0.812	35.32	0.713	36.16	0.771	34.34	0.851	34.13	0.900
21	2400	35.43	0.851	36.46	0.960	—	—	36.76	0.993	38.12	0.813	35.12	0.910
Ave.	2425	36.40	0.873	36.44	0.811	35.32	0.713	36.46	0.782	36.23	0.832	34.62	0.905

TABLE VI.

Amount of uric acid in organs

No.	Body Weight	Liver	Kidney	Spleen	Lung	Brain	Heart	Muscle	Blood from portal vein
	gm.								mg. per 100 gm.
22	2520	5.880	4.540	11.936	5.128	1.102	1.135	1.003	2.806
26	2400	7.212	4.360	9.375	3.751	0.932	1.240	1.624	2.738
27	2100	4.800	3.521	7.440	5.120	1.200	1.480	1.840	2.660
28	2700	5.213	3.102	13.132	3.416	1.010	1.210	1.132	2.884
29	2630	4.785	3.912	12.131	4.012	1.032	0.981	1.012	3.085
31	2400	5.675	2.915	11.112	5.132	0.937	0.835	0.937	2.459
Aver.	2453	5.394	3.725	10.854	4.426	1.035	1.147	1.258	2.772

10.854 mg. of uric acid in the spleen was the largest amount of all, 1.035 mg. in the brain was the smallest per each 100 gm. of organs.

The blood was taken from the portal vein and the ear vein and the amount of uric acid estimated in each case.

The average amount of uric acid from the portal vein was 2.772 mg. per 100 cc. which is about three times more than that contained in the blood from the ear vein i.e. 0.924 mg.

E. Uric acid in the contents of the alimentary canal.

Six cases were used in this experiment.

The alimentary canal, from the stomach to the rectum, was taken out immediately after death, and divided into four parts as stomach, upper intestine (duodenum and small intestine), middle intestine (caecum), and lower intestine (from large intestine to rectum).

The amount of contents and the uric acid contained therein were estimated separately with each specimen.

The result is shown in Table VII.

TABLE VII.

No.	Body Weight	Total Content	Total Uric acid	Stomach		Upper Intestine		Middle Intestine		Lower Intestine	
				Con- tent	Uric acid	Con- tent	Uric acid	Con- tent	Uric acid	Con- tent	Uric acid
	gm.	gm.	mg.	gm.	mg.	gm.	mg.	gm.	mg.	gm.	mg.
34	3000	431.0	12.243	251.5	3.523	20.0	1.835	128.0	5.304	31.0	1.581
35	2400	336.0	9.827	107.0	3.210	90.0	0.743	114.0	4.264	25.0	1.610
36	3000	410.0	18.383	159.0	4.007	64.0	6.912	180.0	7.272	7.0	0.692
37	2650	353.0	13.767	185.0	4.847	32.0	2.912	118.0	5.050	18.0	0.958
39	2500	371.0	13.488	195.0	3.412	41.0	4.312	120.0	4.872	15.0	0.892
40	2400	392.0	13.668	212.0	3.721	50.0	4.123	110.0	4.712	20.0	1.112
Aver.	2700	382.0	13.646	185.0	3.786	50.0	3.473	128.0	5.245	19.0	1.141

The amount of total contents varied from 336 gm. to 410 gm. and the average was 382 gm. and the total uric acid was from 9.827 mg. to 18.883 mg. and the average 13.391 mg.

IV. THE FATE OF URIC ACID INGESTED BY MOUTH.

(The absorption of uric acid through the alimentary walls)

The work on this subject was begun as early as 1848, when Wöhler and Frerichs proved by mouth feeding in man that the animal organism converts the nitrogen of uric acid into urea. The results obtained by them were later confirmed by Neubauer as well as by Zabelin.

Numerous investigations showing greatly increased uric acid excretion after feeding thymus, pancreas, or liver were carried out in 1895-1896 by Weintraut, Unber and others. In 1900-1906, a clear understanding of the different sources of the uric acid was presented by Burian and Schur. About the same time, similar results were also obtained by Siven. In 1895, Weintraut noticed the disproportion between the amounts of purine fed and the amounts of uric acid excreted. Similar results were obtained by Minkowski, Burian and Schur, the first named obtained 49 per cent in the form of uric acid after feeding three grams of hypoxanthin, and the two latter together obtained 46 per cent recovery of urinary purines after giving 1.6 grams of hypoxanthin. Burian and Schur made many feeding experiments with liver, spleen, beef, veal and bacon, and recovered an average purine of about 50 per cent.

In 1910, Schittenhelm and Frank fed sodium nucleate to three subjects and the recovery, in the form of urinary uric acid, was 5, 10, and 41 per cent. Dorn, in a similar experiment, made a recovery of 11 per cent in a normal subject. Rother obtained 12 and 36 per cent in experiments with yeast nucleic acid in two normal cases.

The inevitable weak point in all feeding experiments is the uncertainty as to the extent of absorption, and the form in which absorption takes place. Dorne concluded that the intestinal destruction of most of the purines given was the cause of the low urinary recovery by ascertaining that the excretion of phosphorus was greatly increased in the fæces.

Siven showed that *Bacillus Coli* in a test tube experiment split considerable quantities of purines in 24-48 hours. Thannhauser and Dorfmueller also showed that the bacterial flora of human intestines metabolizes the nitrogen of purines into ammonia. Rother confirmed the ammonia formation in the test tube with purines and human fæces.

In 1876, Salkowski introduced solid uric acid by mouth into dogs and noticed that a part of the uric acid ingested was excreted in the form of allantoin. In 1896, Minkowski also discovered allantoin in the urine of dogs fed with thymus. These findings were confirmed by Chon, Salkowski,

Puduschika, Mendel and others.

Lately Folin, Berglund and Derick mentioned that it is not possible to study the fate of uric acid within the human organism because when lithium urate solution is taken by mouth scarcely any trace of the ingested uric acid finds its way into the urine. Koehler also stated that the effect of ingested uric acid has never been clearly demonstrated on the blood level, and the result of the urinary output being similar in nature, therefore, it was not adaptable to his study, so he made experiments of only four cases and further study was not attempted.

From the results reported in these different papers nothing definite has been proved as to the fate of uric acid or purine bodies ingested by mouth, but it seems now more probable that it has been either destroyed by the bacteria in the intestine or not absorbed, therefore, its fate is still unknown.

The preparation of uric acid for ingestion.

The uric acid used was a preparation of Merck's, which was dried over H_2SO_4 in a vacuum dessicator. For ingestion the mono-lithium urate was formed by the interaction of uric acid with the proper amount of lithium carbonate (Li_2CO_3). The solution was made isotonic with glucose. The following proportions were used:—

Uric acid	1.00 gm.
Lithium Carbonate	0.28 ,,
Glucose.....	1.35 ,,
Distilled water up to	100.00 cc.

This solution was made up just before use with sterile distilled water, boiled for exactly two minutes, the lost water added, and ingested when cooled to body temperature. The reaction of the solution was approximately PH 7. 4. The uric acid content of a portion was determined colorimetrically and the amount ingested based upon this estimation. Approximately 100 milli-grams of uric acid were ingested per kilo of body weight. The ingestion was made by means of stomach tube. Then the absorption of uric acid ingested was observed from various points of view.

TABLE VIII. (A).

No. 41. Male, Body weight, 2490 gm.	Volume.	Specific gravity.	Reaction.	Total nitrogen.	Urea nitrogen.	Ammonia nitrogen.	Creatinine.	Purine bases N.	Uric acid.	Allantoin nitrogen.
	cc.			gm.	gm.	gm.	gm.	mg.	mg.	mg.
Control.	270	1.016	alk.	2.132	1.715	0.020	0.098	3.072	13.14	0.097
<i>Ingested 240 mg. of uric acid.</i>										
1st. 24 hrs. aft. ingest.	250	1.016	alk.	2.013	1.684	0.016	0.131	3.976	14.37	0.137
2nd. 24 hrs.	240	1.014	"	2.173	1.632	0.016	0.089	2.732	13.36	0.203
3rd. 24 hrs.	210	1.016	"	2.135	1.721	0.014	0.098	1.382	16.33	0.078
4th. 24 hrs.	240	1.016	"	1.876	1.532	0.011	0.103	4.134	13.22	0.132
5th. 24 hrs.	220	1.016	"	1.732	1.537	0.018	0.087	4.567	11.43	0.416
6th. 24 hrs.	300	1.014	"	2.231	1.830	0.020	0.099	2.137	13.47	0.222
Average.	243	1.016	"	2.027	1.651	0.016	0.101	3.155	13.70	0.196

(B).

No. 42. Male. Body weight, 2140 gm.	Volume.	Specific gravity.	Reaction.	Total nitrogen.	Urea nitrogen.	Ammonia nitrogen.	Creatinine.	Purine bases N.	Uric acid.	Allantoin nitrogen.
	cc.			mg.	gm.	gm.	gm.	mg.	mg.	mg.
Control,	250	1.016	alk.	1.872	1.466	0.016	0.111	3.432	12.24	0.247
<i>Ingested 214 mg. of uric acid.</i>										
1st. 24 hrs. aft. ingest.	260	1.016	alk.	1.785	1.376	0.021	0.096	4.632	16.25	0.376
2nd. 24 hrs.	240	1.016	"	1.676	1.238	0.020	0.088	3.765	11.76	0.103
3rd. 24 hrs.	210	1.016	"	1.801	1.413	0.020	0.076	3.136	13.66	0.218
4th. 24 hrs.	270	1.014	"	1.632	1.189	0.017	0.103	3.176	13.73	0.091
5th. 24 hrs.	230	1.016	"	1.713	1.276	0.018	0.101	1.376	13.13	0.373
6th. 24 hrs.	240	1.016	"	1.617	1.203	0.020	0.096	3.865	14.17	0.265
Average.	241	1.016	"	1.704	1.282	0.019	0.094	3.325	13.78	0.238

(C).

No. 43, Male, Body weight, 2450 gm.	Volume,	Specific gravity.	Reaction.	Total nitrogen.	Urea nitrogen.	Ammonia nitrogen.	Creatinine.	Purine bases N.	Uric acid.	Allantoin nitrogen.
	cc.			gm.	gm.	gm.	gm.	mg.	mg.	mg.
Control.	270	1.016	alk	1.765	1.438	0.016	0.087	4.40 ²	12.47	0.537
<i>Ingested 245 mg. of uric acid.</i>										
1st. 24 hrs. aft. ingest.	240	1.014	alk.	2.010	1.622	0.020	0.091	3.785	16.75	0.103
2nd. 24 hrs.	310	1.014	"	1.634	1.313	0.011	0.101	4.385	14.32	0.303
3rd. 24 hrs.	209	1.018	"	1.857	1.537	0.011	0.087	—	13.32	—
4th. 24 hrs.	270	1.017	"	2.036	1.703	0.017	0.079	3.964	14.13	0.214
5th. 24 hrs.	220	1.014	"	1.709	1.376	0.019	0.097	4.313	11.37	—
6th. 24 hrs.	310	1.014	"	2.137	1.805	0.015	0.103	4.462	15.18	0.103
Average.	258	1.015	"	1.897	1.559	0.016	0.093	4.181	14.18	0.180

(D).

No. 44. Male, Body weight, 2450 gm.	Volume.	Specific gravity.	Reaction.	Total nitrogen.	Urea nitrogen.	Ammonia nitrogen.	Creatinine.	Purine bases N.	Uric acid.	Allantoin nitrogen.
	cc.			gm.	mg.	gm.	gm.	mg.	mg.	mg.
Control.	260	1.017	alk.	2.015	1.671	0.008	0.103	6.375	16.37	—
<i>Ingested 245 mg. of uric acid.</i>										
1st. 24 hrs. aft. ingest.	280	1.015	alk.	2.132	1.715	0.021	0.085	4.356	14.36	0.317
2nd. 24 hrs.	270	1.015	"	2.076	1.663	0.018	0.076	3.676	16.45	0.103
3rd. 24 hrs.	280	1.015	"	2.147	1.776	0.014	0.069	7.358	16.52	0.333
4th. 54 hrs.	210	1.016	"	1.857	1.321	0.010	0.103	8.652	14.14	0.183
5th. 24 hrs.	300	1.014	"	2.238	1.884	0.015	0.113	7.321	16.43	0.368
6th. 24 hrs.	260	1.016	"	2.099	1.782	0.010	0.089	6.387	17.58	0.093
Average.	267	1.015	"	2.091	1.690	0.015	0.089	6.291	15.91	0.233

(E).

No. 45, Male, Body weight, 2340 gm.	Volume.	Specific gravity.	Reaction.	Total nitrogen.	Urea nitrogen.	Ammonia nitrogen.	Creatinine.	Purine bases N.	Uric acid.	Allantion nitrogen.
	cc.			gm.	gm.	gm.	gm.	mg.	mg.	mg.
Control,	315	1.012	alk.	1.576	1.217	0.014	0.097	2.132	7.15	—
<i>Ingested 234 mg. of uric acid.</i>										
1st. 24 hrs. aft. ingest.	310	1.012	alk.	1.432	1.135	0.013	0.088	4.321	9.36	—
2nd. 24 hrs.	270	1.014	"	1.476	1.176	0.019	0.063	1.361	10.13	0.137
3rd. 24 hrs.	260	1.014	"	1.513	1.237	0.021	0.074	—	6.32	0.332
4th. 24 hrs.	300	1.012	"	1.536	1.233	0.014	0.082	2.332	6.76	0.401
5th. 24 hrs.	320	1.012	"	1.432	1.212	0.009	0.074	2.813	7.37	0.321
6th. 24 hrs.	300	1.012	"	1.413	1.102	0.018	0.074	1.005	7.13	0.109
Average.	293	1.013	"	1.467	1.182	0.016	0.076	2.366	7.85	0.260

(F).

No. 46, Male, Body weight, 2950 gm.	Volume.	Specific gravity.	Reaction.	Total nitrogen.	Urea nitrogen.	Ammonia nitrogen.	Creatinine.	Purine bases N.	Uric acid.	Allantion nitrogen.
	cc.			gm.	gm.	gm.	gm.	mg.	mg.	mg.
Control.	320	1.014	alk.	2.137	1.673	0.021	0.126	3.376	15.63	0.103
<i>Ingested 295 mg. of uric acid,</i>										
1st. 24 hrs. aft. ingest.	300	1.014	alk.	2.013	1.657	0.023	0.090	4.132	17.67	0.302
2nd. 24 hrs.	280	1.014	"	1.967	1.632	0.014	0.077	—	17.96	—
3rd. 24 hrs.	270	1.016	"	2.136	1.700	0.021	0.066	5.372	19.99	—
4th. 24 hrs.	340	1.012	"	2.321	1.712	0.022	0.103	4.038	16.17	0.462
5th. 24 hrs.	310	1.014	"	1.812	1.576	0.023	0.156	3.213	13.38	0.197
6th. 24 hrs.	320	1.014	"	2.136	1.703	0.019	0.114	2.037	13.97	0.223
Average.	303	1.014	"	2.064	1.663	0.020	0.101	3.753	16.52	0.197

(G).

No.	Body weight.	Volume.	Specific Gravity	Reaction	Total Nitrogen.	Urea Nitrogen.	Ammonia Nitrogen.	Creatinine.	Purine Bases N..	Uric acid.	Allantoin Nitrogen.
	gm.	cc.			gm.	gm.	gm.	gm.	mg.	mg.	mg.
41.	2400	243	1.016	alk.	2.927	1.651	0.016	0.101	3.155	13.70	0.198
42.	2140	241	1.016	"	1.704	1.282	0.019	0.094	3.325	13.78	0.238
43.	2450	258	1.015	"	1.897	1.559	0.016	0.093	4.181	14.18	0.080
44.	2450	237	1.015	"	2.091	1.690	0.015	0.089	6.291	15.91	0.223
45.	2340	293	1.013	"	1.467	1.182	0.016	0.076	2.366	7.84	0.260
46.	2950	303	1.014	"	2.064	1.663	0.020	0.101	3.758	16.52	0.197
Aver.	2455	263	1.015	alk.	1.875	1.505	0.017	0.092	3.846	13.65	0.218

A. The excretion of uric acid and other nitrogenous substances in the urine.

Six rabbits were used for this experiment. The urine was collected accurately every 24 hours for six days after the ingestion of the uric acid. The volume of the sample was measured, the specific gravity and reaction were determined, and the following constituents were estimated: total nitrogen, urea, ammonia, creatinine, purine, bases, uric acid and allantoin.

The result is shown in Table VIII A-G.

B. Excretion of uric acid in the faeces.

Ten rabbits were used. The faeces in the cage was collected after the ingestion of the uric acid for seven days (first three days and second four days). The amount of the specimen was measured and the uric acid content in the faeces was determined. The result is shown in Table IX.

C. Uric acid and non-protein-nitrogen in the blood.

Ten rabbits were used for this experiments. In five of these

TABLE IX

Faeces.	Amount	Uric acid.	Amount	Uric acid.	Amount	Uric acid.	Amount	Uric acid.	Amount	Uric acid.
	gm.	mg.	gm.	mg.	gm.	mg.	gm.	mg.	gm.	mg.
No.	47.		48.		49.		50.		51.	
Body weight.	2400 gm.		2140 gm.		2450 gm.		2450 gm.		2340 gm.	
Control, 7 days.	52.0	3.120	103.0	5.356	27.0	1.674	48.0	2.784	72.0	3.672
1st. 3 days.	30.0	1.590	12.0	0.720	50.0	2.200	0	0	40.0	2.480
2nd. 4 days.	50.0	2.350	48.0	3.024	70.0	3.640	56.0	3.416	27.0	1.485
Total.	80.0	3.940	60.0	3.744	120.0	5.840	56.0	3.416	67.0	3.965
Average per day.	11.0	0.563	8.0	0.535	17.0	0.834	8.0	0.488	10.0	0.566

No.	52.		53.		54.		55.		56.	
Body weight.	2950 gm.		2400 gm.		2450 gm.		2400 gm.		2350 gm.	
Control, 7 days.	65.0	3.168	43.0	2.150	112.0	6.160	80.0	5.040	40.0	2.480
1st. 3 days.	0	0	30.0	1.860	12.0	0.744	24.0	1.464	0	0
2nd. 4 days.	46.0	2.806	12.0	0.672	18.0	1.278	60.0	3.480	37.0	1.961
Total.	46.0	2.806	42.0	2.532	30.0	2.022	84.0	4.944	37.0	1.961
Average per day.	7.0	0.401	6.0	0.361	4.0	0.289	12.0	0.763	5.0	0.280

animals, the uric acid and non-protein-nitrogen in the blood were determined at intervals of one hour, two hours, three hours, four hours and six hours and, in the other five, the blood was examined for uric acid and non-protein-nitrogen at intervals of ten hours, twenty-four hours, forty-eight hours and seventy-two hours after ingestion. The result is shown in Table X.

TABLE X. (A)

An amount of non-protein N and uric acid (mg per 100 cc. blood)

No.	Body weight gm.	Before Ingestion.		After 1 hours.		After 2 hours.		After 3 hours.		After 4 hours.		After 6 hours.	
		Nonprotein N..	Uric acid.	Nonprotein N..	Uric acid.	Nonprotein N..	Uric acid.	Nonprotein N..	Uric acid.	Nonprotein N..	Uric acid.	Nonprotein N..	Uric acid.
57.	2400	38.31	0.796	39.12	0.812	—	0.792	39.76	0.832	—	0.807	37.61	0.912
58.	2350	37.69	1.032	38.37	0.992	—	1.071	37.32	1.102	—	1.120	38.13	0.918
59.	2330	40.42	0.967	40.37	0.960	—	0.992	40.04	1.038	—	0.976	40.38	0.832
60.	2400	38.19	0.912	37.36	0.937	—	1.037	37.96	0.976	—	1.132	37.61	1.167
61.	2400	36.76	1.120	36.15	1.032	—	1.137	35.76	1.200	—	0.929	35.52	1.203
Aver.	2370	38.27	0.965	38.27	0.946	—	1.006	38.17	1.029	—	0.997	37.85	1.006
62.	2400	39.14	0.763	40.76	0.813	38.12	0.752	38.71	0.766	40.13	0.789	41.13	0.900
63.	2400	41.32	1.012	40.15	0.965	40.19	0.968	39.67	1.120	39.72	1.013	39.18	1.056
64.	2500	40.17	1.123	37.89	1.056	40.37	1.201	40.15	1.137	40.65	1.096	40.78	0.966
65.	2550	37.68	1.200	35.75	1.200	35.76	0.967	38.00	1.213	36.01	1.176	36.76	1.200
66.	2400	36.63	0.816	34.96	0.765	36.15	0.877	34.46	0.877	34.16	0.765	35.18	0.916
Aver.	2450	38.99	0.983	37.90	0.960	38.12	0.953	38.19	1.023	38.13	0.968	38.61	1.008

As the ingested uric acid on the blood level has never been clearly demonstrated and further no trace of it could be found either in the urine or the faeces, the fate of the uric acid ingested is vague in experiments. *A*, *B*, and *C*.

D. Uric acid in the organs.

Ten rabbits were used. The animals were killed in twos at three, six, twelve, twenty-four and forty-eight hours after

ingestion. The uric acid in the organs, i. e., the liver, kidney, spleen, lung, brain, heart and muscle, was determined, and the blood of the portal vein and the ear vein was also examined for the uric acid. Table XI. shows the results in averaged values.

TABLE XI

No. of animal	Hours after ingestion	Body weight	Blood		Liver	Kidney	Spleen	Lung	Brain	Heart	Muscle
			Ear vein	Portal vein							
		gm.	mg. per 100cc.		mg. per 100 gm.						
67, 68	3	2375	1.080	2.740	5.346	7.060	11.378	4.182	1.094	2.058	2.172
69, 70	6	2300	0.965	3.840	8.102	4.746	11.078	4.273	1.088	1.456	1.759
71, 72	12	2325	0.978	3.575	7.946	4.401	12.639	5.242	1.080	3.621	3.016
75, 76	24	2400	0.954	2.748	6.136	4.832	9.066	3.895	1.053	2.485	2.710
77, 78	46	2225	0.864	3.067	5.063	3.143	10.327	3.621	0.979	1.182	1.714

The amount of uric acid in the spleen and brain did not differ from that of the normal cases, but in the other organs there was an increase. A decided increase was also noticed in the blood of the portal vein taken from rabbits which were killed at twelve and twenty-four hours.

It is therefore shown that the uric acid ingested was absorbed more or less through the alimentary walls by the increased amount of uric acid in the various organs and the portal vein.

E. Uric acid in the alimentary canal.

Twelve rabbits were used. These animals were also killed at three, six, twelve, twenty-four, forty-eight and seventy-two hours after ingestion. The alimentary canal was divided into four parts immediately after death, and the volume measured and the uric acid contents determined, as in the experiment on the normal cases. The result is shown in Table XII in the averaged values.

The amount of uric acid in the stomach was 38.73 mg. after three hours. It gradually decreased and recovered its normal level in from twenty-four hours to forty-eight hours. Uric acid in the upper intestine slightly increased for three hours and the maximum reached was 9.32 mg. after twelve hours. It recovered within forty-eight hours. Uric acid in the middle intestine increased for twenty-four hours and also recovered within forty-eight hours. There was no trace of uric acid ingested in the lower intestine.

This experiment shows that the uric acid ingested did not leave any trace in the lower intestine under the colon.

Therefore, the uric acid ingested is either absorbed or destroyed before reaching the colon; if it has not been absorbed but destroyed, then there must be an increase in the nitrogen.

The next experiment was carried out to solve this question.

TABLE XII.

Hours after digestion	No.	Body weight	Total con- tent.	Total uric acid.	Stomach.		Upper intestine.		Middle intestine.		Lower intestine.	
					con- tent.	Uric acid.	con- tent.	Uric acid.	con- tent.	Uric acid.	con- tent.	Uric acid.
		gm.	gm.	mg.	gm.	mg.	mg.	mg.	mg.	mg.	gm.	mg.
3	79, 80	2425	352.0	50.08	196.0	38.73	40.0	6.593	88.0	4.342	28.0	0.393
6	81, 82	2375	435.0	41.91	205.0	29.24	48.0	5.648	145.0	6.260	37.0	0.757
12	83, 84	2500	341.0	22.52	180.0	7.41	58.0	9.320	82.0	5.462	21.0	0.625
24	85, 86	2450	356.0	24.54	165.0	5.84	35.0	4.596	124.0	11.523	32.0	0.489
48	87, 88	2290	372.0	13.78	178.0	4.70	36.0	2.907	148.0	6.476	11.0	0.388
72	89, 90	2475	427.0	14.38	196.0	3.72	39.0	3.334	163.0	5.940	24.0	0.393

F. The relationship between uric acid and non-protein-nitrogen in the contents of the alimentary canal.

The alimentary canal was divided into four parts as before, and the amount of uric acid and non-protein-N in the content of each part was ascertained. The result is shown in Table XIII.

TABLE XIII.

	Body weight	Stomach			Upper intestine,			Middle intestine,			Lower intestine,			Total contents.	Total uric acid.	Total P. N.	Uric acid in blood.	
		Con- tent.	Uric acid.	Non- P. N.	Con- tent.	Uric acid.	Non- P. N.	Con- tent.	Uric acid.	Non- P. N.	Con- tent.	Uric acid.	Non- P. N.	mg.	mg.	mg.	Ear vein.	Porta l vein.
Control, 2 cases.	2375	191	3.80	204	56	3.47	134	155	4.93	353	33	0.44	71	440	12.64	762	1.000	3.076
After 3 hours.	2400	196	38.73	294	40	6.59	137	88	4.34	361	28	0.39	45	352	50.05	837	0.932	3.640
" 6 hours.	2400	205	29.46	245	49	5.65	130	148	5.76	318	23	0.76	62	439	41.63	785	1.037	4.391
" 12 hours.	2400	180	7.41	231	58	11.32	162	96	5.47	347	21	0.63	51	355	24.88	791	1.200	3.923
" 24 hours.	2240	165	5.84	213	35	4.60	148	124	10.51	355	32	1.57	58	356	22.52	775	0.912	3.613
" 48 hours.	2380	181	3.70	191	36	2.91	132	148	6.37	368	10	0.38	60	375	13.36	751	0.813	2.613
" 72 hours.	2400	200	3.71	190	46	3.48	142	135	5.12	347	19	1.21	70	410	13.52	749	0.991	3.125

The uric acid and the non-protein-nitrogen in the alimentary canal disappeared almost in parallel, but the normal amount of non-protein-nitrogen was so large that a small amount of nitrogen in the ingested uric acid was hardly noticeable. So a larger dose of uric acid (1000-2000 mg.) was introduced into four rabbits and the preceding experiments were repeated.

The results given in Table XIV. A, B, were obtained from two rabbits which were given about 1000 mg. of uric acid mixed with forage and the figures were taken from urine every 24 hours for five days.

The excretion of uric acid in the urine was increased within 72 hours, and after 96 hours the uric acid content in the urine was on normal level. The amounts of extra uric acid excreted were 17.55 and 20.36 mg. within 72 hours, while the total nitrogen, urea and ammonia were greatly increased, as much as 238 and 265 mg. of urea nitrogen and 72 and 13 mg. of ammonia nitrogen. These correspond to 96 per cent of the nitrogen of the uric acid introduced. Purine bases and allantoin did not differ from the normal. The amount of creatinine was decreased.

The uric acid content of the blood was increased within 24 hours.

The amounts of faeces excreted were 53 and 34 gm, for five days and the uric acid in the faeces were only 1.202 and 0.263 mg.

Table XIV. C, D. 2000 mg. were given to two cases and the results were nearly parallel to the preceding experiment. The amounts of extra excretion within 72 hours were 39.69 and 43.77 mg. of uric acid, 506 and 513 mg. of urea nitrogen and 44 and 31 mg. of ammonia nitrogen. These correspond to 84 per cent of uric acid nitrogen ingested.

The uric acid contents in the blood also were increased at 24 and 48 hours after ingestion. The amounts of faeces were 32 and 35 gm. and the uric acid contents were 0.223 and 0.269 mg. for five days.

It has been proved from these experiments that uric acid

TABLE XIV.

No. 165 Male, Body weight 2400 gm.	Volume. cc.	Specific gravity.	Reaction.	Total nitrogen. gm.	Urea nitrogen. gm.	Ammonia nitrogen. gm.	Creatinine. gm.	Purine bases N.. mg.	Uric acid mg.	Allantoin nitrogen. mg.	Uric acid in blood, mg.	Faeces.	
												Vol. gm.	Uric acid. mg.
(A) No. 165. 2400 gm. heavy													
Before 24 hrs.	340	1.014	alk.	1.672	1.337	0.015	0.209	15.69	11.33	0.135	0.958	—	—
After 1st 24	330	1.014	"	1.872	1.513	0.038	0.118	17.27	22.11	0.175	1.972	—	—
After 2nd 24	320	1.014	"	1.773	1.432	0.042	0.103	16.37	13.67	0.203	1.148	—	—
After 3rd 24	280	1.018	"	1.651	1.304	0.037	0.076	15.65	15.77	0.078	1.167	16.0	0.077
Aver	310	1.015	alk.	1.765	1.416	0.036	0.099	16.43	17.18	0.152	—	—	—
Diff	— 30	—	—	+ 0.280	+ 0.238	+ 0.072	— 0.330	+ 2.210	+ 17.55	+ 0.051	—	—	—
After 4 th 24	320	1.014	alk.	1.618	1.271	0.013	0.212	14.38	11.38	0.151	1.021	—	—
After 5 th 24	310	1.004	"	1.715	1.313	0.016	0.212	13.79	12.13	0.132	0.986	37.0	1.125
(B) Na 167. 2400 gm. heavy. 1 gm. of uric acid ingestes													
Before 24 hrs.	300	1.014	alk.	1.563	1.216	0.017	0.193	13.21	9.13	0.202	0.887	—	—
After 1st 24.	330	1.014	"	1.772	1.414	0.031	0.137	24.81	20.36	0.375	2.123	—	—
After 2nd 24.	320	1.014	"	1.685	1.270	0.014	0.055	11.96	17.06	0.246	1.412	—	—
After 3rd. 24	293	1.014	"	1.543	1.229	0.019	0.185	14.00	10.36	0.196	0.796	23.0	0.170
Ave.	308	1.014	alk.	1.667	1.304	0.021	0.126	16.69	15.22	0.272	—	—	—
Diff.	+ 30	—	"	+ 0.303	+ 0.265	+ 0.013	— 0.202	+ 11.03	+ 20.36	+ 0.211	—	—	—
After 4th 24.	300	1.014	alk.	1.473	1.313	0.010	0.173	12.46	10.14	0.213	0.913	—	—
After 4th 24.	285	1.014	"	1.537	1.112	0.009	0.193	13.00	9.37	0.103	0.873	21.0	0.093

TABLE XIV.

No. 168 Male, Body weight 2400 gm.	Volume	Specific gravity.	Reaction.	Total nitrogen.	Urea nitrogen.	Ammonia nitrogen.	Creatinine,	Purine bases N.	Uric acid.	Allantoin nitrogen.	Uric acid in blood.	Faeces.	
	cc.											Vol.	Uric acid.
	gm.			gm.	gm.	gm.	gm.	mg.	mg.	mg.	mg.	gm.	mg.
(C) No. 168. 2400 gm. heavy 2000 mg. of uric acid ingested.													
Before 24 hrs.	310	1.014	alk.	1.722	1.382	0.011	0.105	4.695	9.00	0.196	1.037	—	—
After 24 hrs.	300	1.014	"	1.976	1.601	0.023	0.076	11.67	26.30	0.213	1.600	—	—
After 2nd 24.	330	1.014	"	1.920	1.576	0.041	0.085	4.80	21.44	0.178	1.280	—	—
After 3rd 24.	300	1.014	"	1.835	1.475	0.013	0.113	4.79	18.95	0.096	1.012	17.0	0.132
Ave.	310	1.014	alk.	1.910	1.551	0.023	0.091	7.09	12.23	0.162	—	—	—
Diff.	0	—	"	+ 0.565	+ 0.506	+ 0.044	— 0.041	+ 7.17	+ 39.69	+ 0.101	—	—	—
After 4th 24.	330	1.014	alk.	1.713	1.403	0.012	0.132	5.13	9.00	0.213	1.020	—	—
After 5th 24.	300	1.014	"	1.741	1.357	0.014	0.113	4.88	8.76	0.143	0.968	15.0	0.091
(D) No. 169. 2450 gm. heavy 2000 mg. of uric acid ingested.													
Before 24 hrs.	300	1.014	alk.	1.632	1.273	0.025	0.105	5.77	11.32	0.192	1.003	—	—
After 1st 24.	275	1.016	"	2.013	1.713	0.041	0.075	15.13	37.26	0.337	1.875	—	—
After 2nd 24.	324	1.014	"	1.813	1.311	0.041	0.096	5.94	30.46	0.213	1.993	—	—
After 3rd 24.	315	1.014	"	1.653	1.308	0.024	0.052	5.59	9.00	0.165	1.100	0	0
Ave.	305	1.014	alk.	1.826	1.440	0.035	0.074	8.89	25.91	0.235	—	—	—
Diff.	+ 5	—		+ 0.583	+ 0.513	+ 0.031	— 0.092	+ 9.37	+ 43.77	+ 0.139	—	—	—
After 4th 24.	297	1.014	alk.	1.576	1.307	0.030	0.103	6.71	10.96	0.213	0.971	—	—
After 5th 24.	310	1.014	"	1.713	1.513	0.019	0.073	4.32	9.37	0.119	1.031	35.0	0.269

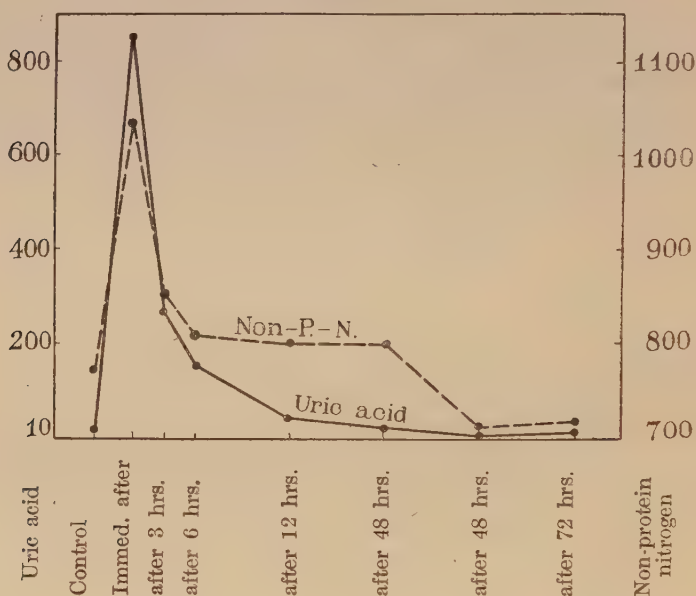
TABLE XV.

	Body weight	Stomach.			Upper intestine.			Middle intestine.			Lower intestine.			Total uric acid.	Total non-protein nitrogen.	Uric acid in Blood.		Uric acid.				
		Non-protein N.			Content.			Uric acid.			Non-protein N.					Content.			Uric acid.			Non-protein N.
		Content.	Uric acid.	mg.	gm.	mg.	gm.	mg.	gm.	mg.	gm.	mg.	gm.	mg.	gm.	mo.	mg. per 100 cc.	mg. per 100	Ear vein.	Portal vein.	Kidney.	Liver.
Control, 2 cases.																						
Immediately after ingestion	2375	191	3.8	204	56	3.5	134	155	4.93	353	38	0.44	71	440	12.64	762	1.000	3.076	3.32	4.76		
After 3 hours,	2300	175	838.0	465	60	3.7	125	145	7.56	361	40	0.56	89	420	849.83	1031	0.887	3.132	2.69	4.13		
After 6 hours.	2250	193	218.0	282	48	61.0	156	137	9.67	347	37	1.03	73	415	289.66	858	0.913	3.757	3.76	5.17		
After 12 hours.	2400	203	91.0	233	59	29.7	142	165	11.32	382	28	0.78	67	455	133.78	824	0.882	4.131	54.40	72.00		
After 24 hours.	2400	180	13.0	198	47	13.7	137	148	16.76	424	35	0.92	58	410	44.35	817	1.532	4.321	57.32	63.76		
After 48 hours.	2300	160	4.1	207	56	4.3	135	105	10.73	405	42	1.32	75	363	20.51	822	1.41	3.251	56.76	48.33		
After 72 hours.	2150	200	3.7	179	58	2.8	121	153	5.32	351	29	1.03	63	440	12.87	714	1.036	3.513	3.76	4.73		
	2400	189	3.1	193	42	3.2	136	163	6.12	333	36	0.76	57	430	13.18	722	1.012	3.716	3.23	4.13		

given in a large dose was excreted in the urine. The amount of uric acid was scarce but it turned into urea and ammonia nitrogen.

The uric acid and non-protein-nitrogen in the alimentary canal and the uric acid in the organs (liver and kidney) were estimated immediately after ingestion, also at three, six, twelve, twenty-four, forty-eight and seventy-two hours, in capacity of 1000 mg. of uric acid. Table XV and Fig. 1 show the result.

Fig. 1.



The stomach contained 838 mg. of uric acid and 465 mg. of non-protein-nitrogen immediately after ingestion and gradually decreased and returned to the normal level within 48 hours. The upper intestine contained 60.96 mg. of uric acid and 156 mg. of non-protein-nitrogen, and reached normal level within 48 hours. The middle intestine increased in uric acid and non-protein-nitrogen from 6 to 24 hours and decreased within 48 hours to the normal level. In the lower intestine, there was

no influence of uric acid and non-protein-nitrogen as in the experiment 100 mg. of uric acid per kilo of body-eight were given. The amount of uric acid in the blood of the portal vein increased at 6 and 12 hours. The uric acid content in organs, especially the liver and kidney, increased greatly from 12 to 24 hours and recovered within 48 hours to the normal level.

Summary.

Heretofore, these experimental studies were carried out on various animals and also on human beings by many investigators, but the absorption of uric acid ingested was not clearly defined and the fate of uric acid ingested by mouth is still unknown.

My experiment shows that the amount of uric acid in the organs and the portal vein plainly increased, although the effect of ingested uric acid has not been clearly demonstrated on the blood level, and also the results of the urinary and fecal output were similar in nature. Moreover, the relationship of uric acid and non-protein-nitrogen in the alimentary canal elucidates its absorption, especially when large doses were introduced into the animal body. The ingested uric acid was clearly absorbed by the alimentary walls.

From the above mentioned experiments, the author presumed that almost all parts of uric acid introduced through the mouth into rabbits must be absorbed by the alimentary mucus membrane and only a fraction of uric acid is excreted in the urine in the form of uric acid, and most of the balance is excreted in the urine as urea and ammonia.

V. THE FATE OF URIC ACID INTRODUCED BY INTRAVENOUS INJECTIONS.

(The destruction of uric acid in the animal body.)

The first thorough study of the destruction of uric acid was made by Croftan, who found that uric acid is destroyed chiefly

in the liver by carnivora, in the kidney by herbivora,* and by both these organs in omnivorous animals—men and pigs. He succeeded in isolating a substance from these organs, an albumose-like body and a nuclein, which was actively uricolytic when united. His results have been criticised by various workers. Similar results have been obtained by Schittenhelm, Wichowski and other observers. In 1893 Pawlow demonstrated that dogs following the production of Eck's fistula, excreted a greater amount of uric acid in the urine, which he attributed to the failure of the liver to oxidize uric acid. Abderhalden, London and Schittenhelm found that this increase in the excretion of uric acid was compensated for by a corresponding decrease in the excretion of allantoin.

In 1924, Folin, Berglund and Derick published a very extensive investigation on the destruction of uric acid within the body. In their studies on the dog, they attempted to determine the site of the destruction of uric acid. They demonstrated that uric acid injected intravenously into the dog was destroyed with extreme velocity and was completely destroyed in about two hours. Not less than seventy per cent is destroyed within the first ten minutes after injection. The speed of the destruction is different in different dogs, but is never irregular. Excretion of uric acid after injection is a minor factor in the matter of destruction, because only a trace of the injected uric acid is found in the urine. These authors concluded that this rapid destruction of uric acid in dogs took place in the circulating blood.

The speed of uric acid destruction in herbivorous animals (goats and rabbits) is less than one-tenth as rapid as that found in the dog. Since the blood of herbivorous animals carry very low levels of uric acid and the speed of destruction is mainly determined by the concentration in the blood, herbivorous animals probably destroy very little endogenous uric acid.

Recently, Bollman, Mann and Magath published papers regarding the destruction of uric acid in their studies on the

physiology of the liver which they summarized as follows:

"Large amounts of uric acid appear in the urine of dogs following hepatectomy which also gives rise to an increase in the uric acid content of the blood. Uric acid injected intravenously into animals following hepatectomy may be almost quantitatively recovered in the urine. Uric acid injected into animals with the liver and both kidneys removed is slowly absorbed by the muscles so that it does not all remain in the circulating blood. Determination of the uric acid content of the blood and muscles several hours after injections shows that the total amount is retained in the body and that but little of it could have been destroyed. The uric acid accumulated in the body of hepatectomized nephrectomized dogs is of the same magnitude as that excreted by the kidneys of hepatectomized animals. The uric acid excreted by the hepatectomized animal is of the same magnitude as the allantoin excreted by the normal dog. The destruction of uric acid in the normal dog depends on the presence of the liver as this process ceases as soon as the liver is removed."

More recently, Stirling confirmed the studies of Bollman, Mann and Magath by his investigations on the lung, heart, liver and kidney preparations.

The uric acid solution for injection was prepared in a similar manner to that used for ingestion. Approximately 100 mg. of uric acid were injected per kilo of body weight. The injections were made by means of syringe, in the marginal vein of the ear, at the rate of about 20 cc. per minute.

A. Excretion of uric acid and other nitrogenous constituents in the urine.

Six rabbits were used in this experiment. The volume, reaction, and specific gravity of the urine were determined, and the total nitrogen, urea, ammonia, creatinine, purine bases, uric acid and allantoin in the urine of a 24 hr. specimen before injection were estimated for the control.

Then the uric acid was injected into the ear vein and the results noted every 24 hours for four days. The Table XVI, A, B, C, D, E, & F.

In cases 91, 92 and 93, a small amount of urine increased after injection, but in general, no distinguishable change in the amount of the urine excreted took place; the specific gravity and reaction also did not differ to the control. The excretion of total nitrogen decreased except in cases 96 and 98. The urea was decreased in all cases, while on the contrary the ammonia increased in all cases. The creatinine was decreased and the allantoin remained normal. The uric acid and purine bases were increased.

The excretion of extra uric acid in four days varied from 3.467 to 85.440 mg., the average being 38.258 mg. In cases 91 and 92, the injected acid was excreted within 24 hours and in cases 93, 96, 97, and 98, the injected uric acid was excreted within 48 hours. The quantities of extra uric acid excreted varied from 5.2 to 34.5 per cent, the average being 16.65 per cent of the injected uric acid.

B. Uric acid content of the blood after injection.

Before injection, the blood taken from the marginal vein of the ear and the uric acid and non-protein-nitrogen contained in same were noted for the control. After injection the blood was withdrawn immediately, and afterwards, at various intervals of 5 minutes, 15 minutes, 30 minutes, 1 hour, 2 hours, 3 hours, 4 hours and 24 hours, and the specimens were determined as shown in Table XVII.

The amount of uric acid in 100 cc. of the blood was between 0.772 and 1.125 mg., the average being 0.963 mg. The amount of non-protein-nitrogen in 100 cc. of blood varied from 35.35 mg. to 40.37 mg., averaging 37.78 mg. in the control (before injection).

Immediately after injection the uric acid and non-protein-nitrogen in the blood suddenly increased in amount, thus:

TABLE XVI.

(A) No. 91. 2400 gm. heavy.

No. 91, Male, Body weight 2400 gm.	Volume.	Specific gravity.	Reaction.	Total nitrogen.	Urea nitrogen.	Ammonia nitrogen.	Creatinine.	Purine bases N.	Uric acid.	Allantoin nitrogen.
	cc.			gm.	gm.	gm.	gm.	mg.	mg.	mg.
Before										
24 hours.	270	1.014	alk.	1.844	1.475	0.015	0.112	8.315	10.981	0.197
After 1st.										
24 hours.	295	1.014	„	1.762	1.419	0.023	0.084	8.460	31.668	0.156
After 2nd.										
24 hours.	240	1.014	„	1.789	1.425	0.036	0.091	5.600	9.520	0.409
After 3rd.										
24 hours.	270	1.014	„	1.825	1.405	0.010	—	2.176	11.375	0.205
After 4th.										
24 hours.	300	1.012	„	1.813	1.451	0.010	0.080	3.317	10.351	0.113
Difference.	+ 25	1.014	alk.	— 0.187	— 0.100	+ 0.021	— 0.075	+ 7.313	+ 18.990	+ 0.095

Extra uric acid excreted was 26.687 mg. or 8.0 per cent in the first 24 hours.

(B) No. 92. 2320 gm. heavy.

Before										
24 hours.	300	1.014	alk.	1.722	1.395	0.018	0.220	5.756	14.499	0.302
After 1st.										
24 hours.	330	1.012	„	1.732	1.375	0.031	0.088	6.809	26.621	0.249
After 2nd.										
24 hours.	310	1.015	„	1.766	1.313	0.039	0.120	3.969	12.710	0.319
After 3rd.										
24 hours.	290	1.014	„	1.637	1.401	0.018	0.093	5.123	12.000	0.197
After 4th.										
24 hours.	350	1.012	„	1.613	1.376	0.019	0.150	6.321	10.132	0.251
Difference.	+ 80	1.014		— 0.140	— 0.117	+ 0.036	— 0.426	— 0.802	+ 3.467	— 0.192

Extra uric acid excreted was 12.122 mg. or 5.2 per cent in the first 24 hours.

(C) No. 93. 2430 gm. heavy.

No. 93, Male, Body weight 2430 gm.	Volume.	Specific gravity.	Reaction.	Total nitrogen.	Urea nitrogen.	Ammonia nitrogen.	Creatinine.	Purine bases N.	Uric acid.	Allantoin nitrogen.
	cc.			gm.	gm.	gm.	gm.	mg.	mg.	mg
Before										
24 hours.	270	1.014	alk.	1.625	1.348	0.017	0.119	1.897	15.209	0.360
After 1st.										
24 hours.	320	1.012	„	1.735	1.299	0.012	0.168	10.676	42.792	0.716
After 2nd.										
24 hours.	310	1.014	„	1.613	1.187	0.031	0.101	6.375	25.375	0.385
After 3rd.										
24 hours.	280	1.014	„	1.535	1.398	0.024	0.121	1.321	14.431	0.215
After 4th.										
24 hours.	300	1.014	„	1.635	1.396	0.010	0.098	2.123	12.315	0.300
Difference.	+ 13			- 0.082	- 0.110	+ 0.010	+ 0.031	+ 12.907	+ 34.077	+ 0.176

Extra uric acid excreted was 30.749 mg. or 15.9 per cent
within 48 hours.

(D) No. 96. 2500 gm. heavy.

Before										
24 hours.	290	1.014	alk.	1.624	1.292	0.010	0.156	1.630	19.334	0.519
After										
24 hours.	250	1.014	„	1.637	1.213	0.027	0.066	17.823	48.132	0.476
After 2nd.										
24 hours.	310	1.012	„	1.582	1.236	0.018	0.081	4.571	32.121	0.532
After 3rd.										
24 hours.	300	1.012	„	1.788	1.485	0.010	0.112	2.132	17.336	0.312
After 4th.										
24 hours.	240	1.014	„	1.654	1.391	0.016	0.135	2.376	16.752	0.132
Difference.	- 6			+ 0.163	- 0.157	+ 0.031	- 0.023	+ 19.582	+ 37.005	- 0.624

Extra uric acid excreted was 41.585 mg. or 16.6 per cent
within 48 hours.

(E) No. 97. 2800 gm. heavy.

No. 97, Male, Body weight 2800 gm.	Volume.	Specific gravity.	Reaction.	Total nitrogen.	Urea nitrogen.	Ammonia nitrogen.	Creatinine.	Purine bases N.	Uric acid.	Allantoin nitrogen.
	cc.			gm.	gm.	gm.	gm.	mg.	mg.	mg.
Before										
24 hours.	320	1.014	alk.	2.132	1.662	0.017	0.132	2.314	14.370	0.317
After 1st.										
24 hours.	290	1.014	„	1.932	1.583	0.038	0.098	6.342	65.761	0.135
After 2nd.										
24 hours.	340	1.012	„	2.237	1.713	0.019	0.076	4.783	19.372	0.413
After 3rd.										
24 hours.	310	1.014	„	1.834	1.523	0.021	0.112	—	12.160	0.103
After 4th.										
24 hours.	270	1.016	„	2.338	1.715	0.017	0.126	1.376	10.764	0.151
Difference.	7			0.137	0.114	0.025	0.117	5.559	50.574	0.466

Extra uric acid excreted was 56.38 mg. or 20.1 per cent within 48 hours.

(F) No. 98. 2650 gm. heavy.

Before										
24 hours.	280	1.014	alk.	1.927	1.598	0.008	0.120	2.375	13.786	0.136
After 1st.										
24 hours.	310	1.013	„	1.836	1.421	0.012	0.091	8.237	68.763	0.112
After 2nd.										
24 hours.	300	1.014	„	1.993	1.455	0.033	0.136	6.453	50.361	0.087
After 3rd.										
24 hours.	260	1.014	„	2.123	1.798	0.012	0.121	7.315	10.136	0.215
After 4th.										
24 hours.	260	1.016	„	2.215	1.823	0.010	0.143	1.376	11.353	0.135
Difference.	+ 1			+ 0.261	— 0.110	+ 0.034	+ 0.011	+ 13.881	+ 85.442	+ 0.007

Extra uric acid excreted was 91.54 mg. or 34.5 per cent within 48 hours.

TABLE XVII.

Amount of non-protein N and uric acid (mg) in 100 cc. of blood.

No.	Body weight (gm)	Before injection.		Immediately after injection.		5 minutes after injection.		15 minutes after injection.		30 minutes after injection.		1 hour after injection.		2 hours after injection.		3 hours after injection.		4 hours after injection.		24 hours after injection.	
		Non-protein N.	Uric acid	Non-protein N.	Uric acid	Non-protein N.	Uric acid	Non-protein N.	Uric acid	Non-protein N.	Uric acid	Non-protein N.	Uric acid	Non-protein N.	Uric acid	Non-protein N.	Uric acid	Non-protein N.	Uric acid	Non-protein N.	Uric acid
99.	2100	36.74	0.772	65.56	14.760	—	9.342	—	4.440	—	2.340	53.43	1.560	—	0.520	50.37	0.760	36.76	—	34.32	0.712
100.	2300	38.12	1.028	—	16.045	96.32	11.265	—	6.213	60.72	3.004	—	1.720	43.76	1.102	—	0.852	37.89	—	39.33	0.922
101.	2500	40.37	0.948	70.38	15.088	—	8.976	—	5.712	—	2.140	51.37	0.892	—	0.963	36.17	—	—	—	40.35	0.837
102.	2130	35.85	0.932	—	14.280	73.12	8.324	—	5.796	55.13	4.200	—	2.400	47.68	1.620	—	0.823	36.76	—	61.32	0.912
103.	2400	38.76	1.125	—	16.762	65.34	9.763	—	5.372	48.31	2.312	66.35	1.763	—	1.032	37.56	1.113	38.12	—	37.68	0.876
104.	2550	37.37	0.972	66.37	18.131	—	10.372	—	7.153	—	3.732	—	2.321	53.33	0.965	—	0.897	40.32	—	47.37	0.901
Ave.	2330	37.780	0.963	67.43	15.841	76.26	9.826	—	5.778	54.72	2.955	57.05	1.776	48.28	1.033	1.37	0.889	37.97	—	43.39	0.860

Uric acid 14.28 mg. - 18.13 mg.

average 15.84 mg.

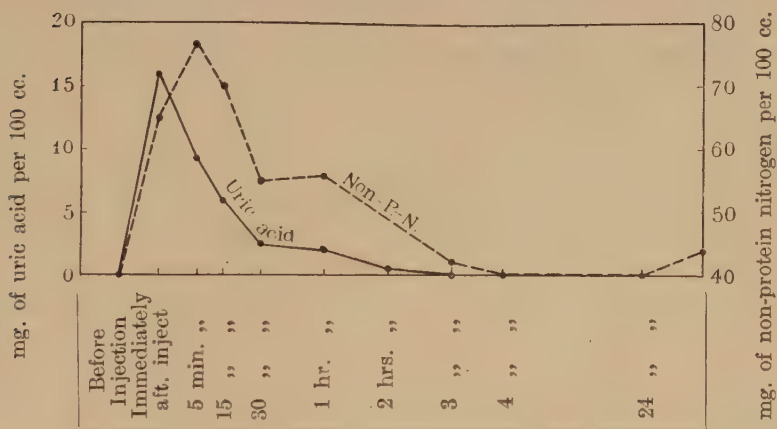
Non-protein-nitrogen .. 65.56 mg. - 70.38 mg.

average 67.43 mg.

Most of the increased uric acid disappeared within 30 minutes after injection, and the extra uric acid entirely disappeared from the blood within 2 to 3 hours.

Non-protein-nitrogen in the blood decreased not so fast as the uric acid, but remained at the level it had reached for about an hour and went down gradually after two hours and reached the normal level within three to four hours. After twenty four hours, uric acid in the blood was normal but non-protein-nitrogen in cases 4 and 6 increased a little after that time. The rabbits, in all cases, suffered from kidney irritation and excreted protein and casts in the urine after injection, but the irritation subsided after 24 to 48 hours. The retention of non-protein-nitrogen in the blood after 24 hours, in cases 4 and 6, may be due to the insufficient functioning of the kidney.

Fig. 2.



The result obtained on the recovery of the injected uric acid in rabbit agrees with those of Burger, Griebach and

Thannhauser and Weinschenk and Warrant in the human experiment. It is explained that considerable uricolysis also goes on in the rabbit's body as well as in the human being. This statement can only be made on the provisional basis that part of the uric acid is not eliminated through other channels as by means of sweat or feces. Although traces of uric acid have been found in the sweat and feces, it has always been assumed that the amount eliminated in these ways is insignificant.

C. Uric acid in organs after injection.

Eighteen rabbits were used in this experiment. The first two rabbits were killed and their organs examined for the control, which had received no uric acid. The remainder were killed in pairs at various intervals—the first pair immediately and the rest 5, 15, 30 minutes, 1 hour, 2 hours, 3 hours and 4 hours after injection, and the amount of uric acid in each organ was determined. The results are shown in the averaged values in Table XVIII. This table shows that the uric acid content of the liver 5 minutes after injection was slightly increased and returned to normal level 15 minutes from the time the injection was made. Of all the organs, the kidneys show the most difference. Immediately after injection the amount of uric acid in the kidneys increased extremely, and varied from 43.34 mg. to 41.34 mg. average 42.34 mg. In 5 minutes after injection, it rose still higher till it reached 53.336 mg., the lowest being 48.365 mg., the average 50.900 mg., and kept this level for 2 or 3 hours and then suddenly dropped to the normal level when the uric acid content in the blood had reached the normal level. In the other organs as spleen, lung, brain and heart, the uric acid increased slightly after injection and then decreased to the normal level within 5 minutes to 30 minutes. In the muscles, retention of uric acid continued until two hours after injection, then gradually decreased, and reached normal within three hours.

TABLE XVIII.

Time after injection.	No.	Body weight.	Blood.		Liver.	Kidney.	Spleen.	Lung.	Brain.	Heart.	Muscle.
			Before	After							
		gm.	mg. per 100 cc.	mg. per 100 gm.							
Control	105.106	2525	1.088	—	5.053	3.619	9.433	3.998	0.870	1.222	1.052
Immediately	109.110	2225	1.058	17.280	10.056	42.340	15.730	11.466	1.570	7.820	7.355
5'	111.112	2300	1.104	15.187	12.282	50.900	18.443	10.214	2.073	8.223	6.896
15'	113.114	2300	0.914	8.733	4.860	46.918	10.823	6.578	1.161	3.666	3.236
30'	115.116	2375	0.997	8.009	4.260	45.312	13.154	7.792	1.079	1.305	2.105
60'	117.118	2325	0.898	1.837	4.623	43.336	8.378	4.472	1.113	2.234	2.186
2 ^h	125.126	2725	1.237	1.340	4.376	43.721	8.318	4.712	0.999	2.313	2.104
3 ^h	127.128	2235	0.958	1.329	6.076	3.526	7.742	4.723	1.045	1.110	1.174
4 ^h	129.130	2275	0.989	1.031	4.707	3.576	9.819	3.206	1.026	0.990	0.942

Killed after injection.

D. The fate of uric acid injected into the rabbit after the portal vein and hepatic artery were ligatured and cut off.

A rabbit was tied in a recumbent position on an operating table and the abdominal cavity was opened on the middle line, and the portal vein and hepatic artery were tied together including surrounding tissues at the heels of the liver and cut to prevent the circulation of blood into the liver. The wound was sutured. Then uric acid, 100 mg. per kilo of body weight, was introduced from the marginal vein of the ear. The uric acid in the blood and organs was determined immediately after death.

The operated rabbits were comparatively quiet for a time but about five or ten minutes before death the respiration became shorter and the animal after suffering very much, finally died in convulsions.

The amount of uric acid in the blood and organs was estimated immediately after death in each case. Results are shown in Table XIX,

TABLE XIX.

Showing uric acid content in the urine, blood and organs of rabbits (all male) into which 100 mg. of uric acid per kilo of body weight were injected intravenously after the portal vein and hepatic artery were ligatured and cut off.

No. of the animal.	Body weight.	Blood (per 100 cc.)		Condition.	u ⁺ in blood.	Uric acid in the bladder urine (per 100 cc.)	Uric acid in Organs (per 100 gm.)					
		Before.	Immediately.				Liver.	Kidney.	Spleen.	Lung.	Brain.	Muscle.
131	2850 ^{gm.}	0.892	0.612	killed after 1 hour	0.992	0.630	3.920	3.600	6.240	2.664	1.034	1.336
132	2500	0.732	14.690	died after 25'	14.400	0.552	5.932	45.712	8.760	16.000	1.321	6.440
133	2450	0.892	17.174	died after 12'	15.392	0.183	2.720	44.744	5.920	18.824	2.132	6.200
134	3000	0.894	14.240	died after 30'	13.320	0.482	7.192	42.512	9.520	9.296	1.345	6.860
135	2550	0.972	14.962	died after 27'	13.752	0.720	5.432	48.491	6.725	17.762	2.102	5.874
136	2450	1.071	17.354	died at 25'	16.765	0.243	7.312	40.372	8.765	15.321	1.612	7.125

* Animal 131, (control), was killed one hour after operation without injection of uric acid.

These experiments demonstrated that the rabbits in which the main blood supply into the liver had been interrupted, died from twelve to thirty minutes after injection. The uric acid in the blood immediately after death at 12 minutes amounted to 17.392 mg., at twenty-five minutes 14.400 mg., at twenty-seven minutes, 15.752 mg. and at thirty minutes 13.387 mg., the average being 15.526 mg., and the average time 23.8 minutes.

From the above, it is seen that the amount of uric acid in the blood decreased very little in some cases, but on the whole, the decrease is not noticeable. Further, the amounts of uric acid in the blood of the operated cases at twelve to thirty minutes are nearly the same as the quantity found in the blood taken

from unoperated cases, immediately after injection. The very small amount of decrease in the uric acid in these cases might be on account of some arterial anomalies. It is true that the main blood supply, the portal vein and the hepatic artery, were cut, but it cannot be said that the blood supply into the liver has been entirely arrested. The liver, therefore, might be supplied with more or less blood, and it might be functioning to some extent.

On the other hand, the amount of uric acid in the organs also increased and the condition was nearly the same as in the blood. It is interesting to note that the amount of uric acid in the liver with its main blood supply stopped was increased, though the amount was very small. This goes to prove that some blood supply into the liver still existed, even when the portal vein and hepatic artery were ligatured and cut-off.

From these facts, the greater part of uric acid introduced into the animal (rabbit) body by means of intravenous injection must have been destroyed in the liver, because the destruction of uric acid had not occurred when the blood supply into the liver was stopped.

E. The fate of uric acid injected into rabbits, which were both nephrectomized.

A rabbit was placed on its belly and tied on an operating table and an incision made in the lumbar portion. The kidney was exposed out side of the fastia and the fat capsule was carefully peeled, and then the vessels, nerve and ureter were ligatured together at the heels of the kidney, and the kidney was taken out. The wound was closed by the suturing of the fastia and the skin.

Both nephrectomies were performed by the aforementioned method, and the cases were injected with uric acid, 100 mg. per kilogram of body weight, immediately after the operation. Then the animals were killed at the same intervals as the liver cases which died at 12, 25, 27 and 30 minutes, and the other two

cases were killed 3 hours after injection.

Cases 148 and 149 were killed 3 hours after injection, and case 137 was killed one hour after operation without injection for the control.

The amount of uric acid in the blood and organs was determined in all cases. See Table XX.

These experiments showed that the uric acid in the blood and organs in the rabbits which were nephrectomized on both sides and injected with uric acid, decreased as much as 8.135 mg. at 12 minutes, 5.320 mg. and 4.460 mg. at 25 minutes, 4.526 mg. at 27 minutes, 3.765 mg. at 30 minutes, 1.008 mg. at 3 hours. The uric acid contents of organs showed almost similar results to those of the normal cases at the same inter-

TABLE XX.

Showing uric acid content in the blood and organs of rabbits injected intravenously with 100 mg. of uric acid per kilo of body weight following both nephrectomies.

No. of animals.	Body weight gm.	Uric acid in Blood (per 100 cc.)		Conditions.	U ⁻ in blood.	Uric acid in Organs (per 100 gm.)					
		Before.	Imme- diately.			Liver.	Spleen.	Lung.	Brain.	Muscle.	Heart.
* 137	2200	1.140	0.875	killed after 1 hour	0.932	4.680	6.960	3.650	1.212	1.040	-
138	2300	0.853	15.334	killed after 25'	5.320	6.280	8.756	6.543	1.332	3.320	—
139	2250	1.012	14.373	killed after 12'	8.136	7.375	9.676	7.372	1.215	3.078	-
140	2500	1.121	15.132	killed after 30'	3.765	5.132	10.751	4.323	—	2.132	—
146	2400	0.963	17.652	killed after 27'	4.526	1.666	9.757	5.632	1.136	3.745	—
147	2400	0.917	14.528	killed after 25'	4.460	5.840	10.321	5.432	1.136	3.457	—
148	2480	0.975	16.769	after { 30'	4.783						
				{ 1 hour	1.978						
				{ 3 hours	1.008	4.658	10.739	4.793	1.005	1.094	0.948
149	2650	1.084	14.784	after { 30'	5.398						
				{ 1 hour	1.785						
				{ 3 hours	0.892	5.749	9.735	5.132	0.892	0.938	—

* Animal 137, (control), was killed one hour after operation without injection of uric acid.

vals. In the rabbits Nos. 148 and 149, killed 3 hours after injection, the uric acid contents in the blood and organs were of normal level.

It has been proved that the injected uric acid completely disappeared from the animal bodies at 3 hours after injection.

These results are almost not different from those of normal animals which were injected, or in other words, this operation had no influence on the destruction of uric acid.

Therefore, the kidney played no part in the uric acid destruction in the body of a rabbit.

F. The fate of uric acid injected into the splenectomized rabbits.

Three rabbits were used for this experiment. The uric acid was injected, 100 mg. for each kilogram of body weight, into the splenectomized rabbits after the animal had recovered from the effects of this operation, which usually takes about a week. Then immediately the uric acid contents of the blood were determined, also at intervals of thirty minutes, two hours and three hours after injection. The results obtained are shown in Table XXI.

The author arrived at results from these experiments, which were similar to those of the nephrectomized animals, and proved that the spleen plays no part in the destruction of uric acid injected into the rabbits.

TABLE XXI.

Showing the uric acid content in the blood of the rabbit injected with uric acid following splenectomy.

No. of animal.	Body weight.	Uric acid content (mg.) in 100 cc. of blood.				
		Before.	Immediately.	30 minutes.	2 hours.	3 hours after injection.
150	2430	0.928	16.732	2.374	1.040	1.007
151	2500	0.768	17.137	3.013	0.739	0.893
152	2760	1.032	14.397	2.132	1.116	1.013

Summary.

From these experiments, the author summarizes as follows:

1. Only a small fraction, average 16.65 mg., of uric acid injected into the rabbit found its way into the urine in four days.

2. Uric acid content in the blood after injection suddenly increased, and the greater part of the extra uric acid disappeared within thirty minutes, then the rest gradually decreased, and the blood level reached the normal within two or three hours.

Non-protein-nitrogen in the blood also increased as well as uric acid, after injection, but it did not decrease so rapidly as uric acid; it maintained its high level for about one or two hours and then gradually decreased, taking three or four hours to reach the normal level. This shows that the uric acid introduced into the circulating blood stream is destroyed before it is absorbed, and the nitrogen of oxidized uric acid remains in the blood for a time, then gradually disappears.

3. Uric acid contents in organs generally increased, but the amount of increase differed greatly in each organ. In the liver, the uric acid content slightly increased five minutes after injection and returned to the normal after fifteen minutes. In the spleen, lung, brain and heart, the uric acid contents increased only slightly, and recovered to normal level after five to thirty minutes. In the muscle, the content increased moderately and went back to the normal almost simultaneously with that of the blood, two or three hours after injection. In the kidney, the content increased very much immediately after injection, remaining stationary at this high level for two or three hours. This may be due to the specialized uric acid-absorbing power of the kidney as stated by Folin and others seeing that only an insignificant fraction is excreted into the urine, the rest going back into the blood as soon as the uric acid in the blood has sunk to a sufficiently low level. The excretory function of the kidney may be temporarily diminished

up to full inhibition as a consequence of the injurious effect of the uric acid; the kidney in these cases remaining loaded with uric acid for two or three hours until the blood level became normal.

4. The blocking of the main blood supply into the liver of the rabbit markedly interfered with the destruction of the injected uric acid in the blood. The extra uric acid in the blood showed no noticeable decrease within thirty minutes after injection in these animals although in the normal cases, the injected uric acid almost entirely disappeared in the same interval. The destruction of uric acid in the normal rabbit, therefore, depends on the circulation of the blood into the liver as this process ceased as soon as the blood supply into this organ was altered.

5. The destruction of uric acid injected into the rabbit following nephrectomy on both sides showed no difference to those of normal unoperated cases. It also showed that the kidney takes no part in the destruction of uric acid in this animal.

6. In the experiments with the splenectomized rabbits, the author obtained similar results to those with nephrectomized animals, and proved that the spleen also has no effect on the destruction of uric acid.

Up to this time, it has been assumed that the uricolysis is brought about by an oxidizing enzyme—"uricase"—which occurs in tissue extracts prepared from the liver, kidney and other organs of animals, therefore uricolysis may take place in various parts within the animal body.

Lately, Folin and others stated that the uricolysis in the animal body after an injection of uric acid, proceeds in the circulating blood, and the uric acid destruction stops the instant the blood is removed from the living animal. Some unknown essential factor, therefore, must be contributed by the tissues or by some tissue, possibly the liver. The unknown oxidizing agency is apparently used up as rapidly as it is poured into

the blood. This agency, therefore, can scarcely be an enzyme.

The results of my experiments, mentioned above, show that the uric acid destruction in the rabbit was arrested almost completely following the stoppage of the main blood supply into the liver, whereas the uricolysis proceeded normally in the cases of nephrectomized or splenectomized rabbits. Moreover, the experiments in test tubes (see next chapter) proved that among the extracts of organs and tissues, only the liver extract possessed activity to destroy the uric acid. From these facts, the author believes that the uricolysis in the body of the rabbit must have occurred in the liver of this animal.

Similar results were obtained by Bollmann, Mann and Magath from their experiments on the hepatectomized dogs. In addition, these results were confirmed by Stirling by his experiments with lung, heart, liver and kidney preparations.

It is necessary to mention that before starting this work two years ago, I found no reference in the literature then available dealing with the study of this sort. The papers of Bollmann and others and also those of Stirling came to my attention after the experiments were finished and, since my findings practically coincide with theirs, I thought it would be well to present this data immediately as the work had been carried out quite independently of them.

VI. EXPERIMENTS IN VITRO.

(DESTRUCTION OF URIC ACID IN THE SOLUTION.)

The author, while experimenting on uric acid, noticed that the oxidation of this acid in an alkaline solution was comparatively rapid, the speed however being influenced by various conditions. He, therefore, considers that the destruction of uric acid in the animal body may be explained to some extent by observing the results of test tube experiments under different conditions.

A. Experiment in an alkaline solution.

The solutions were made up as follows:—1.000 gm. of uric acid was placed into a 500 cc. volumetric flask and to this was added 1/10-n-NaOH solution up to the mark and thoroughly shaken to dissolve the uric acid. 10 cc. of this solution was put into a 100 cc. flask and made up with distilled water to the mark and mixed. This solution contained 20 mg. of uric acid per 100 cc. and was equivalent to 0.81/100-n-NaOH solution, and the hydrogen-ion-concentration was approximately PH 11.93. The uric acid content was determined colorimetrically and the nitrogen was estimated by the Micro Kjeldahl method. 100 cc. of this solution are found to contain 20 mg. of uric acid and 6.600 mg. of nitrogen, while theoretically 20 mg. of uric acid and 6.666 mg. of nitrogen are to be contained.

Each 100 cc. of uric acid solution, mentioned above, was placed into seven Erlenmyer's flasks, and to these were added a few drops of toluene, and closed tightly with a rubber stopper. The flasks were placed in a dark quiet room in a temperature of 18°-22°C., and the uric acid contents in the solutions were determined on 2nd., 3rd., 5th., 7th., 10th., and 14th. days respectively. On the 14th. day, the uric acid in the solution disappeared entirely. Then the total nitrogen, allantoin, urea and ammonia in the solution were estimated,

As table XXIII and figure 3 show, 50 per cent of the uric acid in an alkaline solution was destroyed within five days and disappeared entirely in fourteen days. As is clear from table XXII the allantoin did not show quantitatively as the decomposition product of uric acid. Most of these products were urea and ammonia. The percentage of the former was 60.3 of uric acid nitrogen and the latter 36.5, thus 96.8 per cent of uric acid nitrogen was converted into urea and ammonia. The total nitrogen in the solution was 6.600 mg. before destruction and 6.512 mg. after destruction, with no noticeable difference before and after destruction.

TABLE XXII.

Shows the amounts determined of total nitrogen, allantoin, urea and ammonia in the solution before and after destruction.

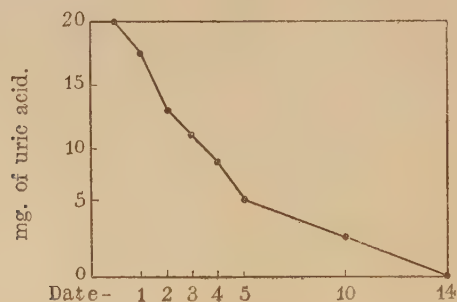
	Total nitrogen	Allantoin nitrogen	Urea nitrogen	Ammonia nitrogen
	mg. per 100 cc.			
Before destruction	6.600	0	0	0
After destruction	6.512	0	4.032	2.436
Percentage			69.3	36.5

TABLE XXIII.

Shows the velocity of destruction of uric acid in the solution.

	After 24 hours	After 48 hours	After 72 hours	After 96 hours	After 120 hours	After 10 days	After 14 days
	mg. of uric acid per 100 cc.						
Uric acid content	17.4	12.9	11.2	9.2	6.1	3.1	0
Per cent of destruction	13.0	35.0	44.0	54.0	69.0	84.0	100.0

Fig. 3.



B. Influence of reaction of solution on the destruction.

100 cc. each of various grades of alkaline solutions (1/10-n-NaOH to 1/500-n-NaOH), neutral and acid solutions (1/500-n-CH₃COOH to 1/10-n-CH₃COOH), which contained 20 mg. of uric acid per 100 cc. were placed into thirteen flasks, a few drops of toluene added and stoppered tight, then they were placed in an incubator at 37°C. The uric acid in the solutions were determined at every 24 hours for 72 hours, and the results are shown in Table XXIV and Fig. 4.

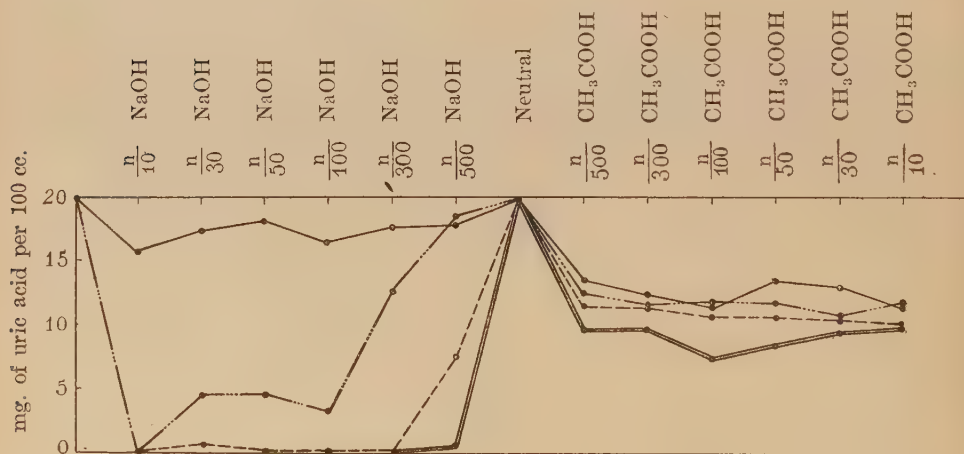
In the concentration of alkali from n/10 to n/500, the destruction of uric acid was completed in 72 hours. The velocity of the destruction of uric acid in n/10 solution was the most rapid, which was completed in 24 hours; n/30 to n/300 came next; and n/500 was the slowest. The rate of uric acid destruction in alkaline solutions, therefore, was parallel to the alkaline concentration in the solution.

In the neutral solution the uric acid did not show any tendency toward destruction. In the acetic acid solutions from n/500 to n/10, 33.5 to 44.0 per cent of the uric acid disappeared after 3 hours, and 51.0 to 58.0 per cent after 72 hours. It seemed as if the uric acid was destroyed quite rapidly, but the acetic uric acid solutions settled into fine crystals immediately after the solutions were made up and, as time elapsed, the crystals became denser. At the end of 72 hours, the solution was titrated to the equivalent of n/100-NaOH with an alkaline solution, and the crystals in the solution disappeared completely and left a mass-like sediment. The uric acid in supernatant fluid was then determined, and the results are shown in the last line of Table XXV. Most of the uric acid which seemed to have disappeared was not actually destroyed but crystallized in the solution and the rate of destruction proved to be from only 0 to 6.5 per cent.

Fig. XXIV.

No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
	$\frac{n}{10}$ NaOH	$\frac{n}{30}$ NaOH	$\frac{n}{50}$ NaOH	$\frac{n}{100}$ NaOH	$\frac{n}{300}$ NaOH	$\frac{n}{500}$ NaOH	Neutral	$\frac{n}{500}$ CH ₃ COOH	$\frac{n}{300}$ CH ₃ COOH	$\frac{n}{100}$ CH ₃ COOH	$\frac{n}{50}$ CH ₃ COOH	$\frac{n}{30}$ CH ₃ COOH	$\frac{n}{10}$ CH ₃ COOH
mg. of uric acid per 100 cc.													
After 3 hours	15.4	17.1	18.0	16.3	17.6	17.9	20.0	13.2	12.1	11.4	13.3	13.0	11.2
After 24 hours	0	4.6	4.6	3.1	12.8	18.2	20.0	12.2	11.4	11.9	11.9	10.8	11.4
After 48 hours	—	trace	0	0	0	7.4	20.0	11.2	11.2	10.6	10.6	10.4	10.0
After 72 hours	—	—	—	—	—	trace	20.0	9.6	9.7	7.4	8.4	9.6	9.8
Alkalized	—	—	—	—	—	—	—	19.7	20.0	19.3	18.9	19.2	18.7

Fig. 4.



*C. Influences of oxygen and nitrogen on
destruction of uric acid.*

100 cc. of uric acid solution were put into each of four flasks. Oxygen gas was introduced into the first flask, nitrogen into the second, and into the third, twenty drops of hydrogen peroxide were added, and the fourth was left alone for the control. A few drops of toluene were added to all of them and closed tightly with rubber stoppers and placed in an incubator at 37°C. The uric acid in the solutions was determined at 15, 30 minutes, 1, 2, 24, 48, 72, 96, and 112 hours respectively, with the result as shown in Table XXV and Fig. 5.

At the end of 48 hours, 79 per cent of the uric acid in the control was destroyed and completely so within 72 hours. In the flask with oxygen gas, 82 per cent was destroyed in 24 hours and completely so in 48 hours. The destruction was

TABLE XXV.

No.	1	2	3	4
	Oxygen.	Nitrogen.	Hydrogen peroxide.	Control.
	mg. per 100 cc.			
After 15 minutes.	17.6	18.5	17.5	19.2
After 30 minutes.	16.4	17.1	13.8	18.7
After 1 hours.	15.2	16.5	12.9	16.2
After 2 hours.	13.6	14.3	10.2	16.2
After 24 hours.	3.6	11.6	0	11.0
After 48 hours.	0	8.7	—	4.2
After 72 hours.	—	5.3	—	0
After 96 hours.	—	3.1	—	—
After 120 hours.	—	0	—	—

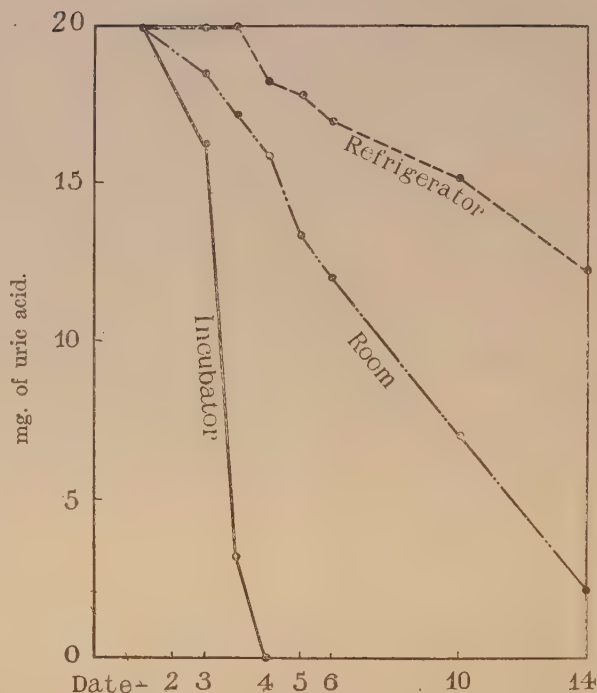
Fig. 5.



TABLE XXVI.

No.	1	2	3
	Incubator at 37°C.	Room Temp 17-25°C.	Refrigerator 3-5°C.
	mg. per 100 cc.		
After 24 hours.	16.3	18.5	20.0
After 48 hours.	3.1	17.1	20.0
After 72 hours.	0	15.8	18.3
After 96 hours.	—	13.4	17.8
After 6 days.	—	12.0	17.0
After 10 days.	—	7.1	15.2
After 14 days.	—	2.3	12.3

Fig. 6.



completed within 24 hours in the hydrogen peroxide flask. On the other hand, the destruction came very slowly in the nitrogen gas flask and took 112 hours to destroy wholly.

D. Influence of temperature on uric acid destruction.

100 cc. of uric acid solution were introduced into each of three flasks with the addition of a few drops of toluene, and tightly stoppered. The first flask was placed in an incubator at 37°C., the second in a room (17-25°C.), and the last into a refrigerator (3-5°C). The uric acid in the solutions was then determined at 24, 48, and 72 hours, and at 5, 6, 10, and 14 days. See Table XXVI and Fig. 6.

In the flask placed in the incubator, the uric acid was des-

troyed within 72 hours. In that of the room, 88.5 per cent were destroyed in the same time and, in the last, only 38.5 per cent in 14 days. The rate of the destruction of uric acid in solution therefore is dependent upon the temperature.

E. Influence of uric acid concentration on the destruction.

A solution of 100 cc. containing 200 mg. of uric acid was used as a standard. 50 cc. of the standard solution were taken into another flask and the volume doubled with distilled water, and from this one half of the volume was taken and doubled again, making the solution one quarter the concentration of the original standard solution, and so on until 1/128 dilution was reached, making eight flasks in all. Toluene was added to these solutions, corked and incubated at 37°C. The uric acid in the solutions was determined respectively at 24, 48, 72, 96 and 112 hours and 7, 8 and 9 days. See Table XXVII.

In the solutions diluted 5 to 8 times, the destruction of uric acid was completed within 24 hours. In No. 5 or 1/16 dilution, the greater part of the uric acid was destroyed in the same period, leaving only a trace of same in the solution. In Nos. 4, 3 and 2, or 1/8, 1/4 and 1/2 dilutions, the rate of destruction was respectively delayed. In No. 1 or the standard, the destruction was 84 per cent in 8 days, and required 9 days for complete destruction.

These experiments showed that the rate of destruction of uric acid in solution to be in inverse proportion to the concentration of the acid.

F. Influence of Bacillus Coli Comminus.

Of sterile uric acid solution 20 cc. were placed into each of seven sterilized test tubes, and plugged with cotton. No. 1 was used for the control without bacteria, and various amounts of *Bacillus coli communis* were added to tubes Nos. 2 to 7 ranging from 1 to 10 platinum loops of a pure culture of bacteria incubated at 37°C. The uric acid contents were determined every

24 hours for 72 hours. The procedures were strictly aseptic. The alkalinity of these solutions was equivalent to 0.83/100-n-NaOH and the hydrogen-ion-concentration was approximately PH 11.95.

These experiments showed that in the control No. 1, the uric acid was destroyed completely within 72 hours. The test tube No. 2, which contained the least amount of bacteria showed destruction of 67 per cent of the uric acid; in tubes Nos. 4 to 6, which contained from 2 to 8 platinum loops of bacteria, the destruction of the uric acid was from 21.5 to 26.9 per cent, and in No. 7 the percentage was 28.9 within 72 hours. The destruction of the uric acid in the solution which contained bacteria was delayed more than that of the control without bacteria, and the degree of destruction of the uric acid depended upon the amount of bacteria added. The changes of hydrogen-ion-concentration in the solution with bacteria were approximately PH 11.95 at the time of the making up the solutions and PH 11.37 after 72 hours. In the control, it was approximately PH 11.54 after the same length of time. Therefore, the hydrogen-ion-concentration of the solution containing bacteria was less than that of the control, and the difference in the reduction was so insignificant as to have practically no effect on the destruction of uric acid.

The hydrogen-ion-concentration of the above solution was inadequate to carry out successfully the experiment with *Bacillus coli communis*. It was therefore repeated under the optimum hydrogen-ion-concentration of PH 7.2 for this bacteria, and the uric acid destruction was observed every 24 hours for 112 hours. See Table XXVIII.

This experiment proved that within 112 hours no destruction takes place in the control nor in the solution with the bacteria.

The author, therefore, cannot agree with the generally accepted theory that uric acid is destroyed by *Bacillus coli communis*.

TABLE XXVII.

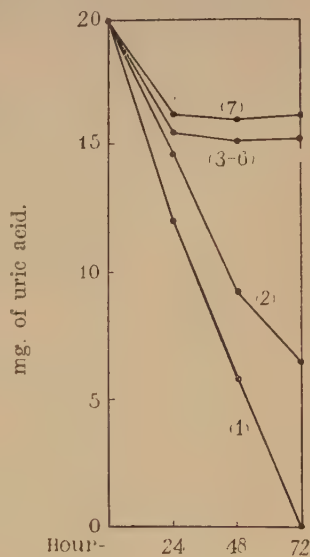
No.	1	2	3	4	5	6	7	8
Dilution.	$\frac{1}{1}$	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{8}$	$\frac{1}{16}$	$\frac{1}{32}$	$\frac{1}{64}$	$\frac{1}{128}$
Uric acid content per 100 cc.	200.0	100.0	50.0	25.0	12.5	6.25	3.125	1.563
	mg. per 100 cc.							
After 24 hours.	173.0	80.0	35.0 ^{1/100}	18.4	0	0	0	0
After 48 hours.	157.0	72.5	21.7	5.3	—	—	—	—
After 72 hours.	142.0	53.5	7.4	0	—	—	—	—
After 96 hours.	103.0	31.5	0	—	—	—	—	—
After 112 hours.	81.0	16.5	—	—	—	—	—	—
After 7 days.	55.0	0	—	—	—	—	—	—
After 8 days.	32.0	—	—	—	—	—	—	—
After 9 days.	0	—	—	—	—	—	—	—

TABLE XXVIII.

No.	Uric acid in solution.	B. Coli Communus added.	After 24 hours.	After 48 hours.	After 72 hours.
	mg.	P. L.	mg. per 100 cc.		
1	20.0	0	12.0	5.9	0
2	"	1	14.6	9.1	6.6
3	"	2	15.6	15.1	15.7
4	"	4	15.4	15.5	15.3
5	"	6	15.0	14.7	15.3
6	"	8	15.1	15.0	14.8
7	"	10	16.1	16.0	16.1

P. L.—platin-loop.

Fig. 7.



G. Influence of adsorption on uric acid destruction.

The preceding experiments proved that the uric acid destruction was delayed more in the solutions with *Bacillus coli communis* than in those without, and the rate of delay depended upon the amount of bacteria added. In other words, the destruction of uric acid in solution was in proportion to the turbidity of the solution. The experiment was done under the consideration that there might be some relationship between uric acid destruction and adsorption.

20 cc. of uric acid solution were placed into each of seven test tubes, No. 1 was used for the control, and to Nos. 2 and 3 were added 0.1 and 1.0 gram of charcoal respectively. To No. 4 and No. 5 were added 0.1 and 1.0 gram of Kaolin, and to No. 6 and No. 7 were added 0.1 and 1.0 gram of Talcum. A few drops of toluene were added to all the tubes. They were then incubated at 37°C, and the uric acid contents determined every 24 hours for 112 hours. See Table XXIX.

In the control the destruction was completed in 72 hours as usual; in No. 2, to which was added a small amount of charcoal (0.1), the uric acid was destroyed completely within 48 hours; in No. 3 which contained a large amount of charcoal (1.0), it required 24 hours for complete destruction. But in Nos. 4, 5, 6, and 7 the percentages of uric acid destroyed at the end of 112 hours were 61.0, 60, 56.5 and 50.5 respectively.

In general, these substances have a similar nature for adsorption. Charcoal hastens destruction whereas kaolin and talcum arrest it.

These experiments demonstrated that the delay in the destruction of uric acid by adding kaolin, talcum and bacteria was parallel to the turbidity of the solution, with the exception of charcoal. It is considered that the molecular surfaces of uric acid are reduced by adsorption, therefore, the destruction must be delayed according to the reduction of oxidative dimension. The reason for the hastening of the destruction of uric acid by

TABLE XXIX.

No.	Uric acid in solution	B. Coli Com- minus added.	After 24 hours	After 48 hours	After 72 hours	After 96 hours	After 112 hours
	mg.	P. L.	mg. per 100 cc.				
1	20.0	0	20.0	19.8	20.1	20.0	20.0
2	"	1	20.0	20.0	20.0	20.0	19.8
3	"	2	20.0	19.6	19.5	19.5	19.5
4	"	4	20.0	20.0	20.0	19.5	20.0
5	"	6	19.5	20.0	20.0	19.8	20.0
6	"	8	19.3	20.0	20.0	19.7	19.7
7	"	10	20.0	20.0	19.7	20.0	19.6

TABLE XXX.

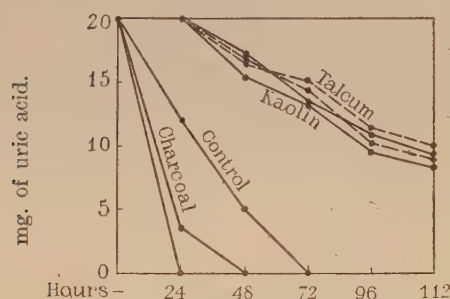
No.	1	2	3	4	5	6	7
	control	0.1 gm. charcoal added.	0.1 gm. charcoal added.	0.1 gm. kaolin added.	1.0 gm. kaolin added.	0.1 gm. talcum added.	1.0 gm. talcum added.
	mg. per 100 cc.						
Before Destruction.	20.00	20.00	20.00	20.00	20.00	20.00	20.00
After 24 hours.	12.00	3.80	0	20.00	20.00	20.00	20.00
After 48 hours.	5.00	0	—	15.60	16.60	16.70	15.80
After 72 hours.	0	—	—	13.70	14.50	14.30	15.00
After 96 hours.	—	—	—	9.50	9.60	10.30	11.00
After 112 hours.	—	—	—	7.80	8.00	8.70	9.10

the addition of charcoal may be attributed to some other factor than of adsorption. From this point of view, it is reasonable to surmise that the adsorption interferes with the destruction of uric acid in the solution.

H. Influences of blood and organ extracts of the rabbit on the destruction of uric acid.

Blood was withdrawn from the carotid artery and jugular vein separately. Potassium oxalate was added previously to

Fig. 8.



prevent coagulation. Organs were taken out immediately after death. The organ extracts were obtained in the following way:

10 grams of still warm organs were well ground with 10 grams of fine sand, and to this added Sørensen's phosphate buffer solu-

tion (PH 7.2) with continuous stirring. It was then made up to 100 cc. and placed for an hour at room temperature, and then filtered through cotton wool. The filtrates were used for the experiment.

Into each of the eleven flasks were introduced 10 cc. of 0.04 per cent uric acid solution (PH 7.2), No. 1 being left for the control. To each of the other nine flasks were added 10 cc. of oxalated blood and organ extracts, and to the last No. 11 were added 10 cc. of liver extract. It was heated on a water bath at 60°C. for 30 minutes, and then made up to 50 cc. with distilled water. Finally a few drops of toluene were added to all eleven flasks and stoppered.

The flasks were placed in an incubator at 37°C. and the uric acid was determined every 24 hours for 96 hours. See Table XXXI.

The uric acid destruction was completed within 24 hours in No. 4, which had received the addition of raw liver extract, but in the control and all the others there was no evidence of the destruction of the uric acid at the end of 72 hours.

I. Influences of extracts of the walls and contents of the alimentary canal on the destruction of uric acid.

The alimentary canal, from stomach to rectum, of a rabbit was taken out immediately after death and divided into four parts i. e., stomach, upper intestine (duodenum and small intestine), middle intestine (caecum), and lower intestine (from large intestine to rectum). The contents were collected and the walls were ground and all the materials were well kneaded separately.

The experiments were performed in a similar manner to that of organs in the preceding chapter. See Table XXXII.

They showed that the contents of the upper intestine destroyed uric acid moderately, its rate being 40 per cent within 72 hours, but in all of the others none.

By experiments "*H*" and "*I*" we know that of these materials, the liver only possesses great power to break up the uric acid in the solution, and the upper intestinal content in a slight degree, whilst all the other materials none.

Similar experiments were conducted on various mammals such as dogs, cats, guinea pigs and rats; and on birds-chickens, ducks and pigeons. On the mammals, we obtained almost the same results as on the rabbit, but with the birds, only the lower intestinal content had any power of destruction which was as follows: 32.8 per cent with chickens, 45.0 per cent with ducks, and 53.9 per cent with pigeons within 72 hours. (See Table XXXIII and XXXIV)

J. Influences of hydrogen-ion-concentration on the destruction of uric acid in the solution, to which was added liver extract.

100 cc. of uric acid liver extract mixture containing 40 mg.

TABLE XXXI.

No.	Organs.	Uric acid content.	After 24 hrs.	After 48 hrs.	After 72 hrs.	After 96 hrs.
		mg. per 100 cc.				
1	Control.	8.000	8.000	7.870	7.910	8.010
2	Arterial Blood.	7.930	8.010	8.000	8.000	8.000
3	Venous Blood.	8.020	7.930	8.070	8.000	7.830
4	Liver.	8.000	0	0	—	0
5	Kidney.	8.110	8.070	8.000	7.670	7.860
6	Muscle.	8.000	7.890	7.860	7.760	8.020
7	Spleen.	8.100	7.770	7.810	8.000	8.000
8	Lung.	8.050	8.000	8.000	8.000	7.900
9	Heart.	8.030	8.000	7.650	7.830	8.000
10	Brain.	7.960	8.000	8.030	8.000	8.000
11	Heated Liver.	8.030	8.040	8.000	7.870	8.010

TABLE XXXII.

No.	Organs.	Uric acid content.	After 24 hrs.	After 48 hrs.	After 72 hrs.	After 96 hrs.
		mg. per 100 cc.				
1	Control.	8.000	8.000	8.000	7.930	8.000
2	Stomach content.	8.030	8.000	8.020	8.030	8.000
3	Upper inte. content.	8.010	7.630	6.240	5.349	4.320
4	Middle inte. content.	8.000	8.000	7.670	7.870	7.820
5	Lower inte. content.	8.070	8.000	7.930	8.030	8.000
6	Wall of Stomach.	8.100	7.870	8.030	7.790	7.690
7	Wall of Upp. inte.	8.000	7.670	7.830	7.910	7.890
8	Wall of Mid. inte.	8.070	8.000	8.000	7.810	7.910
9	Wall of low. inte.	8.000	8.000	7.790	8.030	8.010
10	Heated Upp. inte. cont.	8.050	8.000	8.000	8.030	8.070

TABLE XXXIII.

Dog. No.	Organs.	Uric acid content.	After 24 hrs.	After 48 hrs.	After 72 hrs.
		mg. per 100 cc.			
1	Control.	8.000	8.000	7.860	7.930
2	Liver.	8.000	0	0	0
3	Kidney.	8.000	8.030	8.010	7.930
4	Spleen.	8.100	7.870	8.030	8.000
5	Lung.	8.120	8.100	8.120	8.130
6	Pancreas.	8.070	8.000	8.060	8.050
7	Bile.	8.000	8.000	8.030	8.000
8	Muscle.	8.000	8.040	7.960	7.960
9	Blood.	8.080	8.000	8.000	7.900
10	Brain.	8.070	8.030	8.010	7.830

TABLE XXXIV.

Duck, No.	Organs.	Uric acid content.	After 24 hrs.	After 48 hrs.	After 72 hrs.
		mg. per 100 cc.			
1	Control.	8.000	8.000	7.830	8.000
2	Blood.	8.130	8.030	8.120	8.100
3	Liver.	9.040	9.100	9.110	9.120
4	Kidney.	9.140	9.120	9.150	9.200
5	Lung.	8.170	8.090	8.070	8.150
6	Testicle.	8.050	8.050	8.100	8.110
7	Muscle.	8.070	8.120	8.010	8.000
8	Upper inte. cont.	8.160	8.140	8.100	8.170
9	Lower inte. cont.	9.870	8.960	7.620	5.430

of uric acid and 20 cc. of liver extract were introduced into each of six flasks. The reactions of these mixtures were in six grades of hydrogen-ion-concentration from PH 6.5 to PH 8.0. On the other hand, 100 cc. of uric acid solution without liver extract were placed in each of six other flasks for the control. These solutions contained the same amount of uric acid, and the reactions of the hydrogen-ion-concentration were to similar to the former.

All of these flasks were placed in an incubator at 37°C. and the uric acid contents and the hydrogen-ion-concentration were estimated at the end of 24 hours and 48 hours. (See Table XXXV and Fig. 9).

The experiment showed that the uric acid destruction at PH 7.3 was completed within 24 hours. At PH 7.1—PH 7.7 there remained only a trace of uric acid in the mixtures after the same interval, and in proportion, as the grade of hydrogen-ion-concentration was lowered, the destruction of the uric acid was delayed. On the control side, the uric acid was not destroyed at all at PH 6.5, but in all others to some extent, and the rate was almost parallel to the degree of hydrogen-ion-concentration.

By this experiment, it is seen that the optimum PH for the destruction of uric acid by the liver extract is approximately PH 7.3.

*K. Effect of unknown substance, probably "Uricase",
extracted from the liver of rabbit, on the
destruction of uric acid.*

From the experiment mentioned above, we know that only the liver extract among the various organs, destroys the uric acid in a remarkable degree, in the test tube. By this fact, it may be assumed that the liver of these animals contains some substance, probably uricase, which possesses the power of destroying uric acid.

This substance was extracted from the liver of rabbit in the

TABLE XXXV.

No.	PH.	Uric acid solution with liver extract.				Uric acid solution without liver extract.			
		Before dest.	After 24 hours.	After 48 hours.	% Dest.	Before dest.	After 24 hours.	After 48 hours.	% Dest.
1	6.5	8.010	3.760	0	51.8	8.000	8.000	7.680	0.4
2	6.8	8.000	2.280	0	71.6	8.000	7.880	7.600	1.5
3	7.1	7.830	0.960	0	87.7	7.930	7.520	7.240	5.1
4	7.3	8.030	0	—	100.0	7.880	7.240	6.400	8.1
5	7.7	7.930	trace.	0	100.0	8.010	6.720	6.520	14.8
6	8.0	8.050	0.940	0	88.1	7.850	6.520	6.320	15.9

Fig. 9.

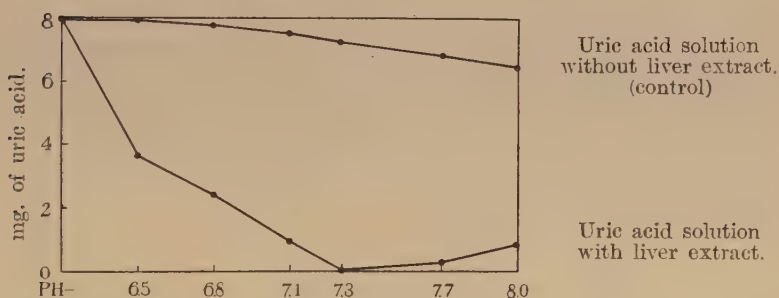


TABLE XXXVI.

No.	1	2	3
Buffer solution pH 7.3	30.0 cc.	30.0 cc.	30.0 cc.
0.04% uric acid solut.	10.0 cc.	10.0 cc.	10.0 cc.
Solid uricase.	—	—	0.1 gm.
Raw liver extract.	—	10.0 cc.	—
Make up with buffer solut.	50.0 cc.	50.0 cc.	50.0 cc.
After 24 hrs. at 37°C.	4.0 mg.	0	0

following manner and its activity upon the uric acid examined.

Preparation of solid uricase from the liver. The minced organs were well ground in a mortar and extracted with three times the amount of Sörensen's phosphate buffer solution (PH 7.3). The mixture was centrifugalized, and the supernatant fluid was poured slowly into 30 times the amount of dry acetone with constant stirring. After the precipitate had settled and the acetone syphoned off, the same volume of dry acetone was added again and stirred thoroughly. After the precipitate had settled, the acetone was again siphoned off and the precipitate filtered on a Buchner funnel and dried in a vacuum dessicator till the acetone smell completely disappeared. The dried material was ground in a mortar into fine powder.

30 cc. of Sörensen's phosphate buffer solution (PH 7.3) and 10 cc. of 0.04 per cent uric acid solution (also PH 7.3) were taken into each of three flasks, No. 1 being used for the control. To No. 2 was added 0.1 gram of dry enzyme equivalent to 10 cc. of liquid extract, and in No. 3 an addition of 10 cc. liquid extract was made, and these three flasks were made up to fifty cc. with Sörensen's buffer solution, and a few drops of toluene were added to each. The flasks were incubated at 37°C. and the uric acid in each of them was determined at the end of twenty-four hours.

In the control, no destruction of the uric acid had taken place, but in No. 2 and No. 3, complete destruction was effected in twenty-four hours. This shows that the activities of a solid preparation and of a raw liquid extract are similar in the destruction of uric acid in solution. (See Table XXXVI)

The decomposition products of uric acid were determined in the solution after the destruction was completed by adding the liver extract. The decomposition products in the solution containing liver extract are quite different from those of plain uric acid solution. The greater part of the uric acid in the former was converted into allantoin, but in the latter it was changed, as mentioned above, into urea and ammonia.

On the other hand the non-protein nitrogen, urea, ammonia and allantoin in the solution which contains only the raw liver extract in the same proportion as in the preceding experiment, and without uric acid, were determined for the control.

The first column and the last of Table XXXVII, show the results of the analysis of the control solution. It contained 7.352 mg. of non-protein nitrogen, 0.039 mg. of urea, a trace of ammonia and no allantoin, at the time the solution was prepared. After the solution was incubated at 37°C. for twenty-four hours, the non-protein nitrogen was increased to 24.02 mg. Urea did not differ noticeably, ammonia was increased in a small amount, but allantoin was not detected.

This result shows that the allantoin does not occur from the liver extract, and the allantoin in this experiment, must be delivered from the uric acid in the solution.

TABLE XXVII.

	Control	No. 1	No. 2	Control.
	Before	After 24 hours.		
Non-prot. nitrogen.	7.352	33.60	27.60	24.02
Allanto'in nitrogen.	0	5.289	5.760	0
Urea nitrogen.	0.039	1.120	1.002	0.032
Ammonia nitrogen.	trace	0.213	1.020	0.123

Summary.

The results obtained from the foregoing experiments in vitro were as follows;—

1. Under ordinary conditions, uric acid dissolved in n/100-NaOH solution (20 mg. to each 100 cc.) was completely destroyed within 14 days, on standing in a room temperature, 18°–20°C.

By oxidation, uric acid yielded urea and ammonia but allantoin could not be proved quantitatively as their decomposition product. The amount of nitrogen of uric acid did not differ noticeably before and after destruction.

2. The velocity of the destruction of uric acid in alkaline solutions was parallel to the alkaline concentration of the solutions, and in neutral and acid solutions, there was no evidence of destruction at a temperature of 37°C. within 72 hours.

3. Oxygen hastened the destruction of uric acid in an alkaline solution, but nitrogen delayed it.

4. The velocity of the destruction increased more and more as the temperature rose.

5. The rate of the destruction runs inversely to the concentration of the uric acid in the solution.

6. Adsorption seemed to protect the uric acid from its destruction.

7. Among the blood and the extracts of organs and the contents of the alimentary canal of the rabbit, only the liver extract possessed great activity in the destruction of uric acid in the solution, and the content of the upper intestine, (duodenum and small intestine) only in a slight degree.

8. Experiments with the extracts of organs of various mammals as the dog, cat, guinea pig and rat, showed almost identical results to those obtained with the rabbit.

9. Optimum hydrogen-ion-concentration of the solution with the addition of liver extract, on destruction, was approximately PH 7.3.

10. A substance (probably "uricase") extracted from the liver of the rabbit possessed similar activity to the raw liver extract in the destruction of the uric acid in the solution.

CONCLUSION.

From the foregoing experiments the author concludes as follows:

1. The uric acid introduced through the mouth into the rabbit is practically all absorbed by the alimentary walls, and the greater part of the extra uric acid is excreted into the urine in the form of urea and ammonia, and a very small fraction is excreted in the form of uric acid itself.

2. The destruction of uric acid introduced by intravenous injections into the rabbit proceeds in the liver and not in any other part.

The author wishes to express his gratefulness to Prof. T. Nagayama for his valuable advice and encouragement, and also for his reading the proof-sheets. His thanks are also due to the Board of the Department for facilities given him in many ways, and to Dr. M. Nishio, instructor in the Bacteriological Department of this College, for kindly supplying the culture of *B. coli communis*.

REFERENCES.

- Bagininski, (1883-84), A., Z. Physiol. Chem., VIII, 395.
 Bass, R., (1913), Zentr. inn. Med., XXXIV, 977.
 T. Bergmann (1876): Opuscula IV, 232 Cf. E. Fischer: Ber. **32**, 435 (1899). Cf. also Synthesen in der purin und Zucker gruppe, F. Vieweg and Sohn, Braunschweig, 1903, and Untersuchungen in die Purin-gruppe (1882-1906), J. Springer, Berlin, 1907. K. K. Bunte: Inaug. Diss. Berlin, 1905.
 Bertrand, G. et Thomas (1919): Guide Pour les manipulations de chimie biologique III,
 Bollmann, J. L., Mann, F. C., and Magath. T. B., (1925). Am. Jour. of Physiol., **72** no. 3, May,
 Burger, M., (1920). Arch. exp. Path. u. Pharmacol., LXXXVII, 392.
 Burian, R., and Schur, H., (1900), Arch. Physiol., LXXX, 241: 1906 LXXXVII, **239**, 1903, XCIV, 273. Burian, R., Med Klin., 1905, I, 131: 1906, II, 479, 514, 540.
 Burian, R., and Shur, H., Z. (1897), Physiol. Chem., XXIII, 55.
 Cech, C. O., (1877), Ber. Chem. Ges., X, 1461.
 Chon, T., Z. (1878), Physiol. Chem., XXV, 507.
 Dorn, M., 1912. Z. Klin. Med.,
 Dorn, M., (1913), Z. Physiol. ChIm., LXXXVI, 130.
 Folin, O., (1905), Am. Jour. Physiol., XIII, 66.
 Folin, O., Berglund, H., and Derick, C., (1924). Jour. Biol. Chem., LX, 2.
 Frank, F., and Schittenhelm, (1900), A., Z. Physiol. IXIII, 269.
 Grewel Hans and Bodo, Richard (1925), Pre. Royal. Soc. London. Seris. B., 97, 321, C. 2169.
 Gudzent, F., (1921) Berl. Klin. Woch., IVIII, 1401.
 Gudzent, Wille, and Keeser, (1921), Z. Klin. XC, 147.
 Griesbach. W., (1920), Biol., Chem., Z., CI, 172.

- Harbaczewski, J., (1889), *Monatsch. Chem.*, X, 624; 1891, XII, 221.
- Hirokawa, W., (1910), *Biochem. Zeitschr.*, XXXI, 441.
- Hunter, A., and Givens, M. H., 1912-13, *Jour. Biol. Chem.*, XIII, 371; 1914, XVII, 37. Hunter, A., *Jour. Biol. Chem.*, 1914, XVIII, 107.
- Hunter, A., Givens, M. H., and Guion, C. M., *Jour. Biol. Chem.* 1914, XVIII, 387. Hunter, A., and Givens, M. H., *Jour. Biol. Chem.*, 1914, XVIII, 403. Hunter, A., and Ward, F. W., *Trans. Roy. Soc. Canada*, 1919, XIII, sect. 4, 7.
- Koehler, A. E., (1924). *Jour. Biol. Chem.*, LX, 3,
- Kossel, A.: and Neumann, A., (1893): *ibid.* 26, 2783 *z. Physiol. Chem.* 22, 188 Kossel, A., and H. (1896). Steudel: *ibid.* 29, 303 (1909). H. Steudel: *ibid.* 30, 539 (1900): 32, 241 (1901). W. Jones: *ibid.* 29, 20 (1899): 30, (1900). W. Gulewitsch: *ibid.* 27, 292 (1899), 27, 368 (1899). O. Gerngross: *Ber.* 38, 3408 (1905). A. Kossel and A. Neumsnn: *Ber.* 27, 2215 (1894). A. Kossel and H. Steudel: *Z. Physiol. Chem.*, 37, 177 (1902): 37, 377 (1903): 38, 49 (1903). F. Mischer: *Verh. Naturf. Gesell. Basel*, 6, 138 (1874). Cf. also the complete work of F. Mischer: *Lve. cit.* 2, 55: *Arch. Exper. Path. Pharm.* 37, 100 (1896). A. Kossel: *Z. Physiol. Chem.* 10, 248 (1886). F. Mischer: *Arch. exper. Path. Pharm.* 37, 100 (1895).
- Lewiss, H. B., and Doisy, E. A., (1918), *Jour. Biol. Chem.*, XXXVI, 1. Lewiss, H. B., Drun, M. S., and Doisy, E. A., *Jour. Biol. chem.*, 1918, XXXVI, 9. Lewiss, H. B., and Cerley, R. C., *Jour. Biol. Chem.*, 1923, IV, 373.
- Ludwig, E. L., *Anz.* (1831), *Akad. Wissensch. Math. naturw. Cl.*, Wien, XVIII, 92. Salkowski, E., and Leube, W. O. L., *Die Lehre von Harn*, Berlin, 1882. Ludwig, E. L., *Wien. Med. Jahrb.*, 1884, 597. Salkowski, E., *Z.*, *Physil. Chem.*, 1890, XIV, 31.
- Mares, F., (1910). *Arch. Physiol.*, CXXIV, 59.
- Mendel, L. B., and Brown, E. W., (1899-1900), *Am. J. physiol.*, III, 201.
- Meyer, H., and Jaffe, M., (1877), *Ber. Chem. Ges.*, 10, 1930. Meyer, H., *Bietrage zur Kenntnisse des Stoffwechsels in Organismus der Huhner*, Dissertation, Königsberg. 1877.
- Minkowski, O., (1886-1893), *Arch. Exp. Path. u. Pharmakol.*, XXI, 41: XXXI, 214.
- Minkowski, O., (1898), *Arch. exp. Path. u. Phrmakol.* XLI, 375.
- Frank, F., and Schittenhelm A., 1900, *Z Physiol* IXIII, 269.
- Schittenhelm, A., and Brugsch, T., 1910. *Der Nukleinstoffwechsel und seine Storungen*, Jena,
- Neubauer C., (1856), *Ann. Chem.*, XCIX, 206.
- Ostwald, W., (1919), *Grosse Manner*, Leipsic. 2nd edition, i.
- Podusschka, R., (1900), *Arch. exp. Path. u. Pharmakol.*, XIV, 50.

- Rother, J., *Z. Physiol. Chem.*, CX, 245.
 Rother, J., (1911), *Z. Physiol. Chem.*, CXIV, 149.
 Salkowski, E., Virchow (1871), *Arch. path. Anat.*, Lii, 58; *Arch. Physiol.*, V, 210.
 Salkowski, E., *Ber. Chem., Ges.*, IX, 719.
 Salkowski, E., *Ber. Chem., Ges.*, XI, 590.
 Salkowski, E. (1898), *Centr. Med. Wissensch.*, XXXVI, 59.
 Siven, V. O., Skand. (1901), *Arch. Physiol.*, XI, 123.
 Siven, V. O., (1912), *Arch. Physiol.*, CXIV, 583.
 Siven, V. O., (1914), *Arch. Physiol.*, CIVII, 582.
 Smentanka, E., (1911), *Arch. Physiol.*, CXXXVIII, 217.
 Schittenhelm, A., (1909), *Z. Physiol. Chem.*, IXII, 243.
 Soetbeer, F., and Ibrahim, J., (1902), *Z. Physiol. Chem.*, XXXV, 1.
 Schittenhelm, A., and Harpuder, K., (1910), *Z. Ges. exp. med.*, XXVII, 436.
 Schade, H. and Boden, E., (1913), *Z. Physiol. Chem.*, IXXXIII, 347.
 Stirling, and Verney, *Proc. Royal Soc. London. Seris. B.* 100, 336-59.
 Scheel, K. W. (1876). *Examen chemicum calculi urinarii*, *Opuscula* 11, 73
 Thannhauser, S. J., and Dorfmueller, G., (1918), *Z. Physiol. Chem.*, CII.
 Thannhauser, S. J., and Bommers, A., (1914), *Z. Physiol. Chem.* XCI, 336.
 Umber, F., (1896). *Z. Klin. Med.*, XXIX, 174.
 Umber, F., and Retzlaff, K., (1910), *Verhandl. Kong. inn. Med.*, XXVII, 436.
 Von Benzur, G., (1909-1910), *Z. exp. Path. u. Therap.*, VII, 339.
 Wahler, F., and Liebig, J., (1838), *Ann. Chem.*, 26, 241.
 Wohler, F., and Freirichs, F. T., (1848). *Ann. chem.*, IXV, 335.
 Weintraut, W., (1895), *Berl. Klin. Woch.*, XXXII, 495.
 Wiekowski, W., (1908), *Beitr. Chem. Physiol. u. Path.*, XI, 109.
 Wiekowski, W., (1909), *Biochem. Z.*, XIX, 308.
 Wiekowski, W., (1910), *Bochem. Z.*, XXV, 431.
 Wiekowski, W., (1909), *Arch. exp. path. u. Pharmakol.* IX, 185.
 Winternitz, M. C., and Jones, W., (1909), *Z. Physiol. Chem.*, IX, 189.
 Miller, J. R., and Jones, W. S., (1909), *Z. Physiol. Chem.*, IXI, 395.
 Zabelin, (1862-63), *Ann. Chem.*, suppl. 2, 326.

ON THE SIGNIFICANCE OF IRON IN BIOLOGICAL OXIDATION.

I. The role of ferrous salt as aldehydase.

By

KUNIO ANDO.

*(From the Biochemical Laboratory, Aichi Medical College.
Nagoya. Director: Prof. Kodama.)*

(Received for publication, January 31, 1928.)

INTRODUCTION.

Recent advance in our knowledge on the biological oxidation especially in its theoretical aspects, owes much to the elaborate works of Warburg (1910-25) and to those of Wieland (1912-23). Warburg postulated the idea that the essential feature of the oxidizing agent in a living cell is a complex iron compound existing on the surface of the heterogenous constituents of the cell. Such an iron molecule finds itself usually in a state of divalence and can form a peroxide with oxygen, which in turn oxidizes an oxidizable substance. Contrary to this theory Wieland advanced the idea that many organic substances could be oxidized through dehydrogenation by means of dehydrogenase in a living cell. In this case oxygen is not indispensable, but serves only as the indirect means of accepting the activated hydrogen, which leads to the formation of hydrogen peroxide and ultimately of water. As to the chemical nature of this dehydrogenase existing in a living cell no information has been presented. At least Wieland has been unable to accept the view that iron takes part in the chemical process of dehydrogenation.

It seems to the author, however, that the controversy between the two theories is not so serious as it seems to be. It is a well established fact that the aqueous solution of a divalent

iron salt exhibits a strong reducing power, which can be attributed to the active hydrogen atom derived from splitting the water molecule as follows.



The bracket means the atom in an activated state.

If there happens to exist a substance to be reduced, for instance, methyleneblue, the activated hydrogen will be readily taken away and there remains iron as a peroxide. This is exactly the same form which Warburg pictures, and it exerts oxidation toward the substances which are designated as hydrogen donors, in the sense of Wieland.

From the above consideration, it is the author's intention to offer the experimental evidence showing that a ferrous salt can behave as oxido-reducer in the way of palladium or platinum black as demonstrated by Wieland and thus to explain the real chemismus played by iron which is an unmistakable constituent of a living cell.

I. Influence of pH on the reduction of methyleneblue by ferrous salt.

For the study of the biological oxidation usually two dynamic methods were used, namely the oxygen uptake and the dye reduction. The latter technique was used throughout this experiment, using methyleneblue as hydrogen acceptor, because this dye has been used by many investigators for the study of the oxidation of tissue and microorganisms, so that it is convenient to compare the result. The rate of the reduction depends upon the activity of the reducing agent and upon the nature of the substance to be oxidized. First of all the author intended to study the influence of pH on the activity of a ferrous salt as a reducer.

Method.—The reaction-vessel consists of a small glass flask of about 15 cc. capacity with a wide and long neck (1×20 cm.), which was equipped with a side tube with tap for evacuation.

The flask was stoppered with a rubber stopper which had one bore in the center to hold the tapped burette of 2 cc. capacity. Into the reaction-vessel 1 cc. of phosphate buffer (pH 6.5–9.5), 1 cc. portion of M/5000 methyleneblue solution, 1 cc. portion of 0.5% gelatine solution and 1 cc. of distilled water were introduced. The burette was filled with M/1200 FeSO_4 solution. The vessel was evacuated for 3 minutes at 10 mm. pressure of mercury and then transferred into the thermostat kept at 25°C. After the lapse of one minute 1 cc. portion of M/1200 FeSO_4 solution was run down from the burette under constant shaking, and the time required for the complete decolorization from the very moment of the addition of the total ferrous salt solution was measured. The results are indicated in Table I.

TABLE I.

The reduction-activity of ferrous salt solution at varying pH.

pH	6.5	7.0	7.5	7.8	8.0	8.4	9.5
Reduction-time	20'	5'15"	4'35"	4'	4'05"	4'40"	5'10"

It seems clear from the above experiment that the slight alkaline reaction favours the reducing activity of the ferrous salt solution. The tendency to less activity at higher alkalinity may be accounted for by the increase of less soluble $\text{Fe}(\text{OH})_2$. This might have the physiological meaning that the tissue iron in a state of ferro may exert at the alkalinity of the body fluid its full reducing power and at the same time full oxidizing efficiency.

II. Influence of certain colloidal substances on the reducing activity of the ferrous salt.

As Warburg demonstrated that the catalytic activity of iron in oxidation was much concerned with the physical and chemical

nature of the surface, on which iron was adsorbed or chemically combined, the author tried in the next experiment to see what influences the various colloidal substances exert on the reducing activity of the iron salt. The experimental procedure was the same as in the foregoing experiment, the only difference being that in this case 1 cc. of 0.5 % solution of the colloidal substance under investigation was added instead of 1 cc. of 0.5 % gelatine solution. The results are shown in Table II.

TABLE II.

Influence of certain colloidal substances on the reducing activity of ferrous salt.

Substance	Reduction-time
Control (aqua)	6'15''
0.5 % Gelatin	4'00''
0.5 % Gummi arabici	4'30''
0.5 % Sericin-pepton	4'40''
0.5 % Egg-albumin	2'40''
0.5 % Edestin	1'30''
0.5 % Milk-serum	1'28''
0.5 % Casein	1'08''
0.5 % Lecithin 1 drop.	immediately.

Apparently the colloidal substances exerted a favorable effect for the reducing of ferrous salt. Among the proteins those of globulin nature seem to have a pronounced effect. It is again astonishing to note that the addition of one drop of lecithin hydrosol prepared from Merk's crude lecithin caused instantaneous decolorization, whereas that of cholesterol caused retardation. As shown by Thunberg (1910-16), Warburg, and lately by Tsuneyoshi (1927), lecithin promoted the oxygen consumption due to oxidation of various organic substances by the tissue oxidase. This was ascribed to the double linkage in the fatty acid molecule existing in lecithin moiety.

In the case of methyleneblue reduction, however, the colloidal nature in addition to double linkage seems to have an important bearing on the chemismus involved. As will be shown later the saturated fatty acids, when they have the tendency to form the colloidal soap solution, showed decidedly a favorably effect. It is at present very difficult to furnish a satisfactory explanation for the phenomena as above observed. But the fact is extremely interesting, when we consider that the vital process of oxidation takes place in the medium of colloidal solutions such as protein and lipid.

III. Influence of aldehyde on the reducing activity of ferrous salt.

In 1904 Schardinger discovered in fresh milk an enzyme, which reduces methyleneblue in the presence of formaldehyde. This enzyme has been regarded as a typical dehydrogenase, which activates and removes the hydrogen atoms of the hydrated molecule of aldehyde, resulting in the formation of the corresponding acid.

Bredig and Sommer (1909) showed in their extensive study on the inorganic ferment that a platinum sol could behave exactly in the same manner as the Schardinger enzyme.

In the following experiment it was shown that ferrous salt behaved as an oxido-reductive in the presence of aldehyde as well as fresh milk. The reaction system consists of

a) 1 cc. of M/10 phosphate buffer (pH 7.8)+1 cc. of 0.5 % gelatine solution+1 cc. of M/5000 methyleneblue solution+1 cc. of aceto-aldehyde of various concentrations+1 cc. of M/1200 FeSO_4 solution.

b) 1 cc. of M/10 phosphate buffer (pH 7.8)+1 cc. of M/5000 methyleneblue solution+1 cc. of aceto-aldehyde of various concentrations+1 cc. of distilled water+1 cc. of the fresh milk.

TABLE III.

Influence of aceto-aldehyde on the reduction of methyleneblue
by ferrous salt.

Concentration of aceto- aldehyde added in %	Reduction-time	
	FeSO ₄ (a)	milk (b)
control (0 %)	4'00''	> 30'
50	2'30''	7'30''
25	2'10''	7'20''
12.5	1'45''	3'30''
6.25	1'35''	2'00''
3.1	2'45''	2'30''
1.55	4'00''	2'50''
0.77	—	4'20''

Though there was this difference between ferrous salt and milk that the former alone could reduce methyleneblue at the concentration adopted, whereas the latter could not, it is still noteworthy that the optimal concentration of aldehyde in both cases are the same. In this case aldehyde alone did not reduce methyleneblue at this standard condition of pH and temperature.

The effect of aldehyde came out more markedly in the next experiment where the relation of ferrous salt to the rate of decolorization in the presence of aldehyde was studied. The result is illustrated in Fig. 1.

As the figure indicates the ferrous salt can reduce methyleneblue in a state of great dilution, where the salt alone can no longer bring about the complete decolorization.

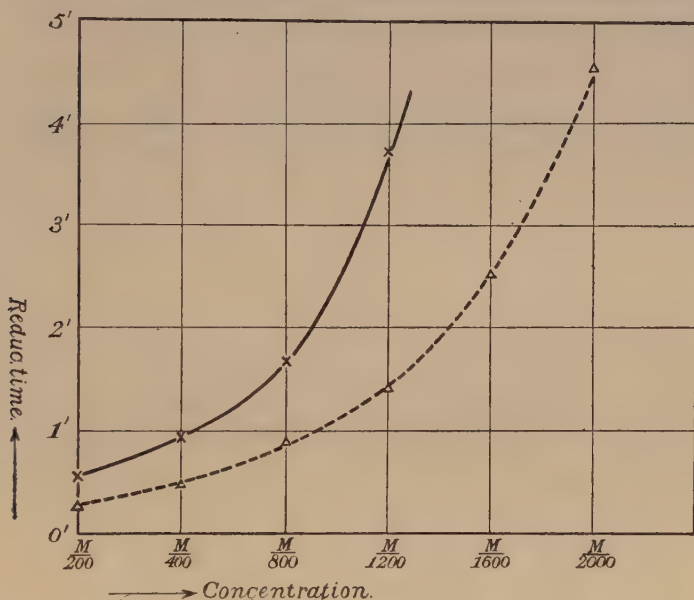
The real chemismus involved here might be explained by assuming that iron peroxid gives oxygen to the aldehyde and returns to the initial divalent state.



Therefore it is possible for Fe⁺⁺ to oxidize aldehyde and reduce methyleneblue catalytically at the cost of water. Here the

Fig. 1.

— Reduc. curve of methyleneblue by ferro-sulphate.
 - - - - - Reduc. curve of methyleneblue by ferro-sulphate + 6 % aldehyde.



aldehyde works as the hydrogen donator in the sense of Wieland.

In this case the idea that aldehyde may give a substance of higher reducing power is not true. This was proved by measuring the reduction potential of the system. The experimental technique was the same as described by Kodama (1926). Into the reactions vessel were introduced:—

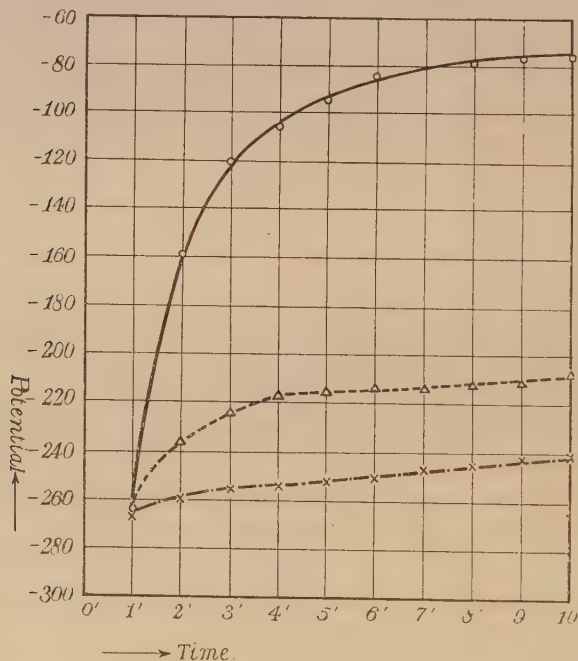
- 1) 3 cc. of M/10 phosphate buffer solution (pH 7.8) + 3 cc. of distilled water + 3 cc. of M/1200 FeSO_4 solution.
- 2) 3 cc. of M/10 phosphate buffer (pH 7.8) + 3 cc. of 6 % aldehyde solution (neutralized by NaOH) + 3 cc. of M/1200 FeSO_4 solution.

The nitrogen gas was bubbled through constantly and the potential was measured every minute from the very moment of the addition of FeSO_4 , using the unipivot potentiometer of the Cambridge Instrument Company. As the working electrode a gold plate ($0.5\text{ cm} \times 0.5\text{ cm}$) was always used.

The results are illustrated in Fig. 2.

Fig. 2. The reduction-potential of ferrous salt in presence of aldehyde.

- Reductions Potential of ferro-sulphate solution ($M/1200$).
- - - - - Reduc. Potential of ferro-sulphate + 6 % acetoaldehyde.
- - - - - Reduc. Potential of ferro-sulphate + $\frac{M}{50}$ Potassium citrate.



It is clear from the above experiment that the initial intensity of the reduction-potential was the same in both cases. But in presence of aldehyde, it was kept almost constant so that the reduction capacity was far greater. This means that aldehyde

did not give a new substance of higher reduction-potential, but only prevented the increase of the inactive form of iron salt.

IV. The effect of KCN on the reduction-activity of ferrous salt.

Warburg observed that the cellular oxidation was to a great extent inhibited by HCN as well as by KCN. He explained this phenomenon by the formation of an inactive complex compound of iron with cyanide and claimed that if the oxidative process of any system is paralyzed by cyanide, then iron may be the chief agent in the chemismus involved. But many cases were reported, where cyanide had no effect at all. For instance, Thunberg (1918) states that succino-dehydrogenase in muscle was not inhibited by cyanide of its methyleneblue reducing power in the presence of succinic acid, whereas strong inhibition was observed in the experiment of oxygen uptake. Hopkins and his coworkers (1920-25) also state that the Schardinger enzyme and xanthin oxidase from milk are not at all sensitive toward cyanide. They concluded, therefore, that those oxidation systems have nothing to do with iron. In the case of the author's experiment as above described the addition of cyanide to the system should result in complete inhibition.

This actually occurred in the experiment, where ferrous salt only was present. But curiously enough, in the presence of 1 cc. of 6 % acetoaldehyde KCN, up to the concentration of M/20, there was not exhibited the the slightest retardation in the activity of ferrous salt, as the experimental data in the Table IV. clearly shows.

The reason why the presence of aceto-aldehyde leads to the total suppression of the action of KCN can not be given at present in a convincing manner. It is likely, however, that more kindred affinity or adsorbability of aceto-aldehyde to iron, in ionic or colloidal state, may hinder the access of KCN to it. This is not limited to aceto-aldehyde but is usually the case with a hydrogen donator of high potency, such as citric acid

TABLE IV.

Effect of KCN or HCN on the reduction-activity of ferro-sulphate.

Reaction mixture:—

1) 1 cc. of M/5 phosphate buffer (pH 7.8) + 1 cc. of 0.5 % gelatine solution + 1 cc. of M/5000 m.b. solution + 1 cc. of distilled water + 1 cc. of cyanide solution of various concentrations + 1 cc. of M/1200 FeSO_4 solution.

2) 1 cc. of M/5 phosphate buffer (pH 7.8) + 1 cc. of 0.5 % gelatine solution + 1 cc. of M/5000 m.b. solution + 1 cc. of 6 % acetoaldehyde solution + 1 cc. of cyanide solution of various concentrations + 1 cc. of M/1200 FeSO_4 solution.

3) 1 cc. of M/5 phosphate buffer (pH 7.8) + 1 cc. of M/5000 m.b. solution + 1 cc. of 6 % aceto-aldehyde solution + 1 cc. of cyanide solution of various concentration + 1 cc. of distilled water + 1 cc. of fresh milk.

Concentration of KCN or HCN	Reduction-time		
	(1) FeSO_4	(2) FeSO_4 + aceto- aldehyde	(3) milk + aceto- aldehyde
0 mol	5'30''	3'30''	2'50''
1/10 KCN	∞	15'	2'50''
1/20 "	"	3'30''	2'50''
1/80 "	"	3'30''	2'50''
1/60 "	"	3'30''	2'50''
1/2500 HCN	"	4'10''	3'10''
1/500 "	"	3'50''	3'00''

etc. Therefore, the inhibitory action of KCN might be greatly influenced by the nature of the chemical milieu. In addition to this, iron in certain complex compounds as in hemoglobin has been assumed to be far more resistant toward KCN than in a free ionic state. From these considerations one must be cautious before coming to the conclusion that a biological process, upon which KCN has little action, has no bearing with iron.

V. *The effect of mercuric chloride on the reduction-activity of ferro-sulphate.*

A fairly dilute solution of mercuric chloride is toxic to the Schardinger enzyme. This was exactly the case with ferro-

On the Significance of Iron in Biological Oxidation. 197

sulphate. Moreover, it is noteworthy that the lower limits of the concentration sufficient for complete inactivation in both cases are the same, as will be shown in the following table.

TABLE V.

Effect of HgCl_2 on the reduction-activity of ferro-sulphate and fresh milk

Reaction system:—

1) 1 cc. of M/5 phosphate buffer(pH 7.8)+1 cc. of M/5000 methyleneblue solutions+1 cc. of 6 % aceto-aldehyde solution+1 cc. of HgCl_2 solution of various concentrations+1 cc. of distilled water+1 cc. of fresh milk.

2) 1 cc. of M/5 phosphate buffer (pH 7.8)+1 cc. of M/5000 methyleneblue solution+1 cc. of 0.5 % gelatin solution+1 cc. of HgCl_2 solution of various concentrations+1 cc. of 6 % aceto-aldehyde solution+1 cc. of M.1200 FeSO_4 solution.

Conc. of HgCl_2 in mol.	Reduction-time.	
	(1) milk+aceto-aldehyde	(2) FeSO_4 +aceto-aldehyde
1/100	>30'	>30'
1/200	"	"
1/400	"	"
1/800	16'30"	16'40"
1/1600	6'20"	4'00"

VI. Temperature coefficient.

It is stated by many investigators that Schardinger's enzyme has the temperature coefficient of about 2.0. The ferro-sulphate system also showed the mean value of 1.86.

Schardinger noted that the optimal temperature for his milk enzyme was nearly 70°C. The ferro-system showed a similar temperature optimum, but in the presence of oxygen it soon became inactive. See Table VI.

DISCUSSION.

From the foregoing experiments the role of ferrous salt as an aldehydase has been ascertained, and many points of similarity between the Schardinger enzyme and ferro-salt have been presented.

TABLE VI.

Temperature coefficient of the reducing activity of ferrosulphate

Reaction system:— 1) 1 cc. of M/10 phosphate buffer (pH 7.8) + 1 cc. of M/5000 methyleneblue solution + 1 cc. of 0.5 % gelatine solution + 1 cc. of distilled water + 1 cc. of M/1200 FeSO_4 solution.

Temperature.	Reduction-time.	Temp. coefficient.
25°C	5'30"	25°-35° 1.7
30°	4'25"	30°-40° 1.87
35°	3'30"	40°-50° 2.0
40°	2'20"	average = 1.86
45°	1'30"	
50°	1'10"	

It might be suggested, therefore, that iron in certain organic compounds may be the essential feature of the Schardinger enzyme. On this point further researches are going on in this laboratory. As to the kinetics of the reduction of ferro-sulphate the author assumed the splitting of the water molecule as its first step. Wieland also pictured the initial activation of the hydrogen of the water molecule, which became attached to aldehyde. The similar hydrogen of the hypoxanthin and xanthin molecule was also assumed when oxidized into uric acid by xanthin oxidase.

Why the enzyme must react only with the water molecule attached to the organic one is very difficult to be accounted for.

One is rather tempted to assume that the enzyme, as in the case of ferro-salt, can attack the water molecule approaching it, and transfer the activated hydrogen to its acceptor and the oxygen to the donator. Therefore, the principal difference between the views of Wieland and that of the author is, whether the oxidation of the donator is ensued by the primary activation of hydrogen in the molecule, followed by the transfer to another reducible substance, or by the direct action of the activated oxygen on the donator, which may result, in either

On the Significance of Iron in Biological Oxidation. 199

oxygenation or hydrogenation, depending on the chemical constitution of the donator. Hence the author's idea on the true kinetics of the oxidation rather agrees with the view of Warburg. But it differs from the latter's in the point of oxygen activation. Warburg believes in the direct activation of molecular oxygen by the catalysis of iron, while the author is inclined to believe that the oxygen atom of the water molecule is simultaneously activated by the catalyst as the result of the activation of the hydrogen molecule, for which the atmospheric oxygen molecule simply serves as acceptor.

CONCLUSION.

1. Using methyleneblue technique it was proved that an inorganic ferrous salt could act as aldehydase.

2. Various colloidal substances such as protein and lipid perhaps by virtue of their surfaces, promoted the rate of decolorization.

3. Potassium cyanide less than M/20 exhibited no poisonous effect in the condition examined.

4. Mercuric chloride was found to be highly toxic.

5. The temperature coefficient was 1.86. Thus a number of similarities between ferrous salt and the Schardinger enzyme as aldehydase were discussed.

REFERENCES.

- Bredig and Sommer (1909): *Zeitschr. f. physik. Chem.* Bd. **70** 34.
Hopkins (1921): *Biochem. Jl.* **15**. 281.
Hopkins and Dixon (1922): *Jl. of biol. Chem.* **54**. 527.
Dixon and Thurlow (1924,1925): *Biochem. Jl.* **18**. 971. **19**. 672.
Kodama (1926): *Biochem. Jl.* **20**. 1094.
Schardinger (1904): *Chem. Zeitung* **28**. 704.
Tsuneyoshi (1927): *Jl. of Biochemistry*. **7**
Thunberg (1910,1916): *Skand. Arch. f. Phys.* **24**. 90. **33**. 228.
Warburg (1910-1925): *Ascher-Spiro. Erg. Physiol.* **14**. 253.; *Z. f. physiol. Chem.* **66**. 305 **69**. 452 **92**. 231; *Bioch. Zeitschr.* **113**. 257 **119**. 134. **136**. 266 **142**. 518 **152**. 479 **145**. 461. **163**. 252. **165**. 196.; *Pflüger. Arch. Gesamt.* **200**. 203; *Z. f. physik. Chem.* **92**. 231.; *Ber. d. deut. chem. Gesell.* **58**. 1001.
Wieland (1912-1924): *Ber. deut. chem. Gesell.* **45**. 484. **45**. 2606. **46**. 3327. **47**. 2089. **54**. 2353.; *Ergebnis d. Physiol.* **20**. 477.; *Liebig Ann. d. Chem.* **436**. **431**. **432**. **439**.

ON THE SIGNIFICANCE OF IRON IN BIOLOGICAL OXIDATION.

II. The rôle of ferrous salt as oxido-reductase for various organic substances.

By

KUNIO ANDO.

*(From the Biochemical Laboratory, Aichi Medical College.
Nagoya. Director: Prof. K. Kodama.)*

(Received for publication, January 31, 1928).

In the previous paper the author presented the evidence that ferrous salt may act as aldehydase in exactly the same manner as Bredig's platin sol and Wieland's palladium black, and suggested its possible connection to the Schardinger enzyme. The biological significance of this action of ferrous salt is very important, when we consider that many organic food substances give aldehyde as an intermediate metabolic product.

In this paper the author intends to give additional importance to the rôle of ferrous salt as an agent responsible for the oxidation of various substances, which seem to be the common metabolites in the animal body. The results obtained in a number of the following experiments strongly suggest that iron displays the predominant role in the chemismus of anoxibiotic oxidation.

The experimental method used is the same as in the foregoing experiment.

I. THE EFFECT OF VARIOUS SUGARS ON THE REDUCTION-ACTIVITY OF FERROUS SALT.

Warburg and Yabusoe (1924) found that purified fructose, but not glucose, was auto-oxidable in the present of neutral phosphate. Meyerhof and Matsuoka (1924) ascribed

this spontaneous oxidation of fructose to the catalytic action of the contaminated metals such as Cu, Fe, and Mn.

Quite recently G. Blix (1927) observed that the fructose phosphate could reduce methylene blue, and the rate of the reduction was enormously accelerated by the addition of a minute amount of iron or copper salt. In the author's experiment almost similar results were obtained as indicated in Table I.

TABLE I. The effect of sugars on the reduction-activity of ferrous salt.

Reaction mixture:—1 cc. of M/5 phosphate buffer (pH 7.8) solution + 1cc. of M/5000 methyleneblue solution + 1cc. of 0.5% gelatine solution + 1cc. of sugar solution + 1cc. of M/1200 FeSO_4 solution.

Sugar	Concentration in mol.	Reduction-time
Fructose (from inulin)	M/5	55''
„	M/10	1'25''
„ (puriss crist. Merk)	M/10	1'25''
Mannoss	M/10	2'15''
Galactose	M/10	3'00
Glucose (pure Merk)	M/10	3'30''
„ (Kahlbaum, but coloured)	M/10	1'30''
Sacchrose	M/10	3'00
Lactose	M/5	2'10''
„	M/10	2'30''
Maltose	M/10	3'00
Arabinose	M/10	3'40''
Glycogen	1 %	1'30''
Starch	1 %	3'30''
Control		3'40''

The accelerating effect of various hexoses stands in the order of fructose, mannose, galactose and glucose. The result accords with that of G. Blix.

Among the disaccharose, lactose seems to have a more favorable effect than sacchrose and maltose. With regard to the

sugars of large molecular weight, it is worthy of notice that glycogen shows definitely an accelerating effect, whereas this is not the case with starch solution.

At present it is very difficult to give any satisfactory explanation for the different activities of various kinds of sugars. But the recent advance in the chemistry of the catabolic and anabolic processes of the sugar molecule has placed a unique importance on the role of fructose phosphate and the glycogen. It might be fairly assumed, therefore, that iron may participate in the actual metabolism of sugar in the animal body.

II. THE EFFECT OF MONOHYDROXY- AND KETONIC ACIDS ON THE REDUCING ACTIVITY OF FERROUS SALT.

Thunberg (1911-25) suggested in his extensive study on the intermediate metabolism that an organic substance, by addition of which the rapid decolorization of methyleneblue by means of the hydrogenase in a living tissue resulted, could be looked upon as a substance, which appears actually in the metabolic process in the animal body.

In the next experiment the author tried to get an additional point of similarity between the types of oxidation effected by the animal tissue and by ferrous salt toward various substances which are important metabolic products, namely: lactic acid, β -oxybutylic acid, glycolic acid, pyruvic acid and aceto acetic ester. These were used in the form of neutral salts.

The results is given in Table II

It is noteworthy that the lactic, pyruvic, and aceto acetic acids which are usually believed to be the actual intermediate metabolic products, showed a marked effect. Pyruvic acid itself had strong reducing power so that 1 cc. of its M/100 solution could reduce methyleneblue in seven minutes, without the aid of ferrous salt. But the presence of the latter greatly accelerated the reduction.

TABLE II. The effect of monohydroxy-and ketonic acids on the reducing activity of ferrous salt.

Reactions system: -1 cc. of M/10 phosphate buffer (pH 7. 8)
 +1 cc. of M/5000 methyleneblue solution+1 cc. of 0.5% gelatine
 solution+1 cc. of the solution of the substance under consideration
 +1 cc. of M/1200 FeSO_4 solution.

Substance	Concentration in mol.	Reduction-time
Lactic acid	M/10	1'30''
"	M/40	1'55''
"	M/80	2'30''
β -oxybutylic acid	M/10	3'50''
"	M/40	3'55''
"	M/80	4'00
Glycolic acid	M/10	2'20''
"	M/40	3'10''
"	M/80	3'30''
Pyruvic acid	M/100	45''
"	M/400	1'25''
"	M/800	1'40''
Aceto acetic acid (ester)	M/10	1'05''
"	M/40	1'20''
"	M/80	1'50''
Control		4'00

III. THE EFFECT OF DIBASIC- AND TRIBASIC ACIDS ON THE ACTIVITY OF FERROUS SALT.

The author tested oxalic acid, succinic acid, fumaric acid, maleic acid, malonic acid, malic acid, tartaric acid and citric acid. All these acids were used in the form of neutral salt.

As is clear from Table III. Oxalic acid is not the promoter in the reduction of methyleneblue by ferrous salt. This coincides with the fact that the acid is very resistant to the oxidation in the animal body. Succinic acid was more ready oxidable than fumaric, and maleic acid. This also is very interesting as this acid is found to be actually existing in the muscle and to be a

On the Significance of Iron in Biological Oxidation. 205

TABLE III. The effect of dibasic and tribasic acids on the reducing activity of ferrous salt.

Reaction mixture:—1 cc. of M/10 phosphate buffer (pH 7. 8)+1 cc. of M/5000 methyleneblue solution+1 cc. of 0.5% gelatine solution+1 cc. of di and tribasic acid solution (neutralized by NaOH) +1 cc. of M/1200 FeSO_4 solution.

Conc. in mol.	Reduction-time							
	Oxalic acid	Malonic acid	Fumaric acid	Maleic acid	Succinic acid	Tartaric acid	Citric acid	Malic acid
1/10	6'00	35''	—	6'30''	2'30''	1'03''	40''	50''
1/20	4'45''	38''	6'30''	6'00	3'40''	1'15''	45''	55''
1/40	4'40''	40''	5'00	5'00	3'50''	1'20''	1'10''	1'10''
1/80	3'20''	1'00	4'50''	4'45''	4'00	1'20''	1'20''	1'30''
1/160	4'00					1'33''	1'30''	2'05''
Control						4'00		

good hydrogen donator for methyleneblue by means of succinodehydrogenase. It is prominent that dibasic and tribasic hydroxy acids are far more effective.

IV. THE EFFECT OF AMINO ACIDS ON THE REDUCING ACTIVITY OF FERROUS SALT.

Warburg (1920-24) has proved that certain amino acids could be oxidized easily to ammonia, carbondioxid and water on the surface of charcoal containing iron, at ordinary temperature. The author also tested various amino acids in their behavior towards methyleneblue reduction by ferrous salt, and obtained approximately the same results as Warburg; namely, glycine, cystine and leucine were most effective.

The agreement of the results obtained, one by the oxygen uptake and the another by the methyleneblue reduction, suggests again strongly that oxygen serves here simply as hydrogen acceptor just as is the case of as methyleneblue.

TABLE IV. The effect of amino acids on the reducing activity of ferrous salt.

Reaction mixture:—1 cc. of M/10 phosphate buffer (pH 7. 8)+1 cc. of 0.5% gelatine solution, +1 cc. of amino acids solution+1 cc. of M/5000 methyleneblue solution+1 cc. of M/1200 FeSO₄ solution.

Substance	Conc. in mol.	Reduction-time.
Glycin	1/10	1'30"
Cystin	1/50	50"
"	1/100	1'00"
Leucin	1/50	1'05
Alanin	1/10	3'00"
Phenylalanin	1/10	3'40"
Tyrosin	(1/10)	3'40"
Glutamic acid	1/10	3'00"
Control		3'40"

V. THE EFFECT OF FATTY ACIDS ON THE REDUCTIONS-ACTIVITY OF FERROUS SALT.

In the animal body all fatty acids are catabolised with ease to carbon dioxid and water. But nothing is known about the ferment, which brings about this oxidation.

Also there exists no direct evidence whether β -oxidation can be started by the dehydrogenation or the direct oxidation. The experiment carried out here with the view to discover whether iron may in any way partake in the chemismus involved resulted in the negative. Formic, acetic, propionic, butylic acids showed no acceleration in the methyleneblue reduction by ferrous salt under the condition employed. But in pursuing further experiments with higher fatty acids an unexpected fact was met with. As manifest in the following table the fatty acids of more than 8 carbon atoms showed a remarkable tendency to accelerate the decolorisation, and this seems to increase with the number of carbon atoms. It is also noteworthy that unsaturated fatty acids as oleic and leinolic acids are far better than saturated. Also

lecithin is extremely effective, perhaps partly owing to the unsaturated fatty acid in the molecule.

TABLE V. The effect of fatty acids on the reduction activity of ferrous salt.

Reaction system:—1 cc. M/10 phosphate buffer (pH 7.8)+1 cc. of M/5000 methyleneblue solution+1 cc. of 0.5% gelatine solution +1 cc. of fatty acid solution (neutralized by NaOH)+1 cc. of M/1200 FeSO_4 solution.

Fatty acid	Conc. in mol.	Reduction-time
Formic acid	1/10	4'10''
Acetic acid	1/10	3'55''
Propionic acid	1/10	4'10''
Butylic acid	1/10	5'00
Valerianic acid	1/10	4'40''
Capronic acid	1/10	4'40''
Caprylic acid	1/10	1'40''
Capric acid	1/10	instantly
Lauric acid	1/500	5''
Palmitic acid	1/5000	6''
Stearic acid	1/5000	13''
Oleic acid	1/5000	5''
Linolic acid	0.001%	instantly
Lecithin	0.001%	"
Cholesterol	1/100	8'10''
Control		4'00''

DISCUSSION.

As often referred to before, Thunberg made extensive studies on the oxidative activity of frog muscle by his initiated method of methyleneblue reduction. The frog muscle itself, has a strong reducing power against methyleneblue in absence of oxygen. But by washing it with distilled water repeatedly this power is weakened to a certain limit. Whether this stationary reduction is caused by the residue of a donor substance or is intrinsic to the reductase is an open question. The similar

so-called rest reduction was also observed by Quastle (1924-25) on various microorganisms. But it might be interesting and justifiable to mention here that this rest reduction stands in close analogy in the author's experiment to the reduction of ferrous salt in the absence of a donator. If, therefore, iron constitutes the essential part of this active enzyme and exists in a state of divalence, such a rest reduction may be expected.

As to the donator nature of various organic substances Thunberg's work on frog muscle, and Quastel and his coworkers' experiments on various bacteria are important in relation to the author's work.

Thunberg's suggestion, that a substance which accelerates the methyleneblue reduction by reductase may be an actual intermediate substance, is supported by various experimental facts by himself and other investigators. For instance, succinic acid which was found to be an active donator for muscle reductase by himself, and independently by Batteri and Stern, has been actually isolated from frog muscle by Einbeck (1914-19).

Therefore his postulation as to the donator-nature of a substance and its relation to the intermediate metabolism has been justified. May it not be urged that if a number of substances, which are active donators towards the enzyme in tissue, also exhibited quite similar behavior towards a synthetic catalytic system, then the active agent in the latter may also be the essential feature of the former. At any rate, it is extremely interesting to compare the results obtained by the model experiment using ferrous salt as the active agent with those of Thunberg and Quastel, on muscle and bacterium coli respectively. For the sake of convenience the author has brought those results together in the following table.

On the Significance of Iron in Biological Oxidation. 209

Substance	Thunberg (Muscle)		Quastel (B. coli)		Author (FeSO ₄)	
	Conc.	Reduc. intensity	Conc.	Reduc. time.	Conc.	Reduc. time.
Control		—		>6h		4'00
Formic acid	M/25.M/50	++	M/13	1'30''	M/50	4'10''
„			M/130	2'	M/100	3'50''
Acetic „	M/25.M/50	++	M/4.3	2'48''	M/50	3'55''
„			M/130	—	M/100	3'45''
Propionic „	M/25.M/50	—	M/4.3	26'	M/50	4'10''
„			M/130	—	M	
Butylic „	M/25.M/50	++	M/4.3	3'	M/50	5'00
„			M/130	—	M/100	3'55''
Iso-butylic	M/25.M/50	—	M/4.3	3'		
„			M/130	—		
Iso-valeric	M/25.M/50	—	M/4.3	5'		
„			M/130	—		
Valeric „			M/6.5	23'	M/50	4'40''
Carbonic „	M/25.M/50	+	M/6.5	—	M/50	4'40''
Caprylic „					M/50	1'40''
Oxalic „	M/25.M/50	—	M/4.3	—	M/50	6'00
Malonic „	M/25.M/50	—	M/4.3	4h	M/50	35''
Succinic „	M/15.M/40	++	M/4.3	4'	M/50	2'30''
„			M/130	11'		
Fumaric „	M/25.M/45	+			M/100	6'30''
Maleic „	„	+			M/50	6'30''
Glycolic „	M/25	—	M/4.3	3'	M/50	2'20''
β-oxybutylic „	M/25	+			M/50	3'50''
Malic „	M/25	++			M/50	50''
d-Tartaric „	M/25.M/50	—	M/4.3	21'	M/50	1'03''
Citric „	M/15.M/45	++	M/4.3	>60'	M/50	51''
Glycin	M/15.M/45	—	M/9.7	>6h	M/250	1'37''
Alanin	M/25.M/50	+	M/11.6	65'	M/50	3'13''
Leucin	M/25.M/50	—	M/17	>3h	M/250	1'10''
Phenylalanin	M/25.M/50	—			M/50	4'00
Glutamic acid	M/25.M/50	++			M/50	3'13''
Glucose	M/25.M/50	—	M/1750	5'30''	M/50	3'34''

Substance	Thunberg (Muscle)		Quastel (B. coli)		Author (FeSO ₄)	
	Conc.	Reduc. intensity	Conc.	Reduc. time	Conc.	Reduc. time
Lavulose					M/50	60''
Mannose					M/50	2'26''
Galactose			M/1400	60'	M/50	3'15''
Lactose					M/50	2'42''
Maltose			M/1400	>2h	M/50	3'15''
Arabinose			M/21	>2h	M/50	4'00

On the donator nature of lower fatty acid homologs the ferro system as quite inactive, while formic, acetic, butylic acids were strongly active in muscle and coli. But in the recent work carried out by Tsubura (1925) on plain-and striated muscles Thunberg's observation was not verified. What condition has brought out this difference needs further research.

Among dibasic acids *oxalic acid* deserves special attention. As depicted by Thunberg and Quastel this acid has showed not only poor activity as donator but also a certain inhibitory effect in the reduction of methyleneblue as well as in the oxygen uptake. An exactly similar retardation of decolorization was also observed in the case of ferrous salt in a high concentration of oxalic acid. This behavior of oxalic acid seems to have an intimate concern with the pH of the medium. When a phosphate buffer of pH greater than 8.0 was used oxalic acid turned to be a promotor. But in the vicinity of a pH corresponding to the reaction of the body fluid this acid manifested itself as an inhibitor. Whether oxalic acid works as a hydrogen acceptor concurring with methyleneblue needs experimental verification. *Malonic acid* is a good donator towards the ferro system while this is not the case with muscle and coli. According to Dakin (1922), however, this acid in contrast to oxalic acid, is readily oxidized in the animal body. *Succinic acid* is the most active donator for muscle but this is not so conclusive in the case of

the ferro system, which might be accounted for by the acceptor nature of fumaric acid produced.

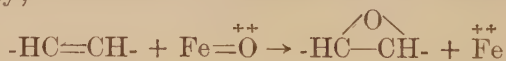
As to *tartaric acid* Thunberg reported the oxidation of only l-form by muscle tissue in accordance with the earlier experiments of Brion (1898). But Neuberg and Saneyoshi (1911) have found that there existed no appreciable difference in their oxidability in the body between the d- and l-tartaric acids. Malic and citric acids are easily oxidized in the animal body and also are fairly good hydrogen donators towards methyleneblue by means of muscle. Exactly the same result was met with ferrous salt.

With regard to amino acid the accelerating effect of glutamic acid in muscle and coli was not observed with ferro-salt, but towards glycin, alanin, leucin and cystin this has showed the attitude of an active catalyser, agreeing with the results obtained by Warburg using the oxygen uptake technique.

Among various sugars glucose and fructose were found by Quastel to be extremely good donators for *B. coli* and, though in less degree, for *B. prodigiosus*. But for muscle glucose was totally inactive according to Thunberg, though the behavior of fructose was not studied. In the author's experiment with ferrous salt fructose was found most active but glucose totally inactive when pure preparate from Merk was tested. To the contrary the slightly coloured preparate of Kahlbaum was found to be highly active. Perhaps this coloured contamination may be responsible for it.

The effect of higher fatty acids might not be accounted for by their functions as donator. It seems to the author more rational to ascribe it to the function of the surface connected to the colloidal nature of the soaps of the fatty acids saturated or unsaturated. From caprylic acid upwards the aqueous solution of their alkali salts manifest the colloidal character as betrayed by turbidity. The physiological meaning of this experimental fact though speculation, seems not less important when we consider that the cellular protoplasma is built of a colloidal mixture

of protein and lipid. The latter is assumed to exist in a certain form of the heterogenous phase, designated as Altman granula, on which Kakiuchi (1927) has already called attention in relation to its significance for biological oxidation from another point of view. We can well imagine, therefore, that cellular iron, when it exists on the surface of such granula may work with its full efficiency. In addition to this surface action the unsaturated linkage has definitely a noticeable effect. But it should be remembered that in this case there is a tendency by which once completely reduced methyleneblue may be reoxidised after a certain interval. In this connection reference may be made again to the works of Warburg (1914), Thunberg (1910-) and Tsuneyoshi (1927) stating that lecithin and really the unsaturated fatty acid promote the oxygen uptake due to iron to a considerable extent. However, in the case of the methyleneblue reduction the author can not ascribe the promoting effect solely to the unsaturation of the fatty acid molecule but also to the colloidal surface exhibited by these substances. Thus the double bond and the surface of an unsaturated fatty acid may be responsible for its enormous activity. When we consider that the once reduced methyleneblue is apt to be reoxidised in the case of unsaturated fatty acid, it seems probable that this serves as a temporary oxygen carrier in the following way;



and when $\overset{++}{\text{Fe}}$ was gradually transformed into an inactive form as in the case of the author's experiment, then this oxygen again oxidizes the leuco-methyleneblue. In this connection it is interesting to refer to the observation by Thunberg and Quastel on the activity of fumaric acid in regard to the methyleneblue reduction by muscle and *B. coli* respectively. They found that in this case the decolorization was never complete due to the reoxidation. Therefore, it might be assumed that such a reversal of the reaction of fatty acid is attributed

to the double linkage.

Reviewing as a whole the behaviors of the various substances as donator one can not deny a close resemblance between dehydrogenase in tissue or cell and ferrous salt in regard to their reducing activity for methyleneblue. Of course there exist many different points. But this can be quite possible when we consider that the activity is greatly modified by the physical and chemical milieu in which the active agent finds itself. For instance as R. Kuhn (1926) demonstrated iron in certain organic compounds can work as catalase or as peroxidase according to the nature of prosthetic organic substance. Quite recently Quastel (1926) also expressed the idea that there is no need to postulate different enzymes for different donators. A certain active center can give rise to the activation of various organic substances, which can be predicted from their chemical constitution. But it must be remembered that besides its chemical constitution its accessibility to the active center should play an important role. It might be justifiable, therefore, to say that the varied natures of the surface may bring about different, that is more quantitative, behavior of the active agent.

As the active center Quastel supposed a spot of intense electric field due to mono-molecular arrangement of some unknown organic substance on the cellular or intracellular surface. But such a hypothesis adds nothing to our knowledge of the real nature of the oxidizing enzyme. In this connection the only suggestion ever made was that of Warburg. Though his theory of oxygen activation due to iron was criticized by many investigators, still it is to his great merit that he has adduced the paramount importance of the surface to the biological oxidation. Moreover, his iron theory can withstand all objections so far made when the new interpretation as advanced by the author is applied.

Thus it might be fairly assumed that iron plays a predominant role in the chemismus of biological oxidation.

CONCLUSION.

In this communication the role of ferrous salt as oxido-reductase was discussed. Among various organic substances those, which have been easily oxidized *in vivo* were also proved to be good donators for the ferrous salt and the methyleneblue system. Higher fatty acids and lecithin were found to be extremely powerful accelerators. The explanation was sought in the involvement of the surface action, exhibited by the aqueous solution of these fatty substances. The conclusion was drawn that Warburg's iron may serve as oxido-reductase in the phenomena of biological oxidation.

REFERENCES.

- Blix, G. (1927): Skand. Arch. f. Physiol. **50** 8.
 Brion (1898): Hoppe-Seyler. Z. f. physiol. Chem. **25**, 283.
 Dakin (1922): Oxidation and reduction in the animal body (monogr)
 Einbeck (1919): Bioch. Zeitschr. **95**, 296.
 „ (1914): Z. phy. Chem. **90**, 301.
 Kuhn, R. (1926): (Sitzung. der zuricher chem. Gessellschaft. 18) Berichte d. deutsch. chem. Gesell. 23.
 Kakiuchi (1927): Jl. of Biochemistry. **7**, 263.
 Meyerhof (1923): (Pflueger) Arch. ges. Phys. **199**, 531.
 Meyerhof and Matsuoka (1924): Bioch. Z. **150**, 195.
 Neuberg and Saneyoshi (1911): Bioch. Z. **36**, 31.
 Tsubura (1925): Biochem. Jl. **19**, 393.
 Tsuneyoshi (1927): Jl. of Biochemistry. **7**, 267.
 Thunberg (1911): Skand. Arch. Phys. **24**, 23.
 „ „ „ **24**, 90.
 „ (1911) „ „ **25**, 37.
 „ (1917) „ „ **35**, 163.
 „ (1916) „ „ **33**, 228.
 „ (1920) „ „ **40**, 1.
 „ (1925) „ „ **46**, 137.
 Quastel and Wetham (1924): Biochem. Jl. **18**, 519.
 „ (1925): „ „ **19**, 520.
 Quastel, Wetham and Stephenson (1925): Biochem. Jl. **19**, 304.
 Quastel and Wooldrige (1925): „ „ **19**, 652.
 Warburg and Yabusoe (1924): Bioch. Z. **146**, 381.
 Warburg and Negelein (1920): „ „ **113**, 257.
 Warburg and Brefeld (1924): Bioch. Z. **145**, 461.
 Warburg (1914): (Pflüger) Arch. ges. Phys. **155**, 547.

ÜBER DIE KOLLOIDSTABILITÄT SCHWER LÖSLICHER SALZE.

VON

KUNIO ANDO.

*(Biochemisches Laboratorium, Aichi Medizinische Universität.
Direktor: Prof. Dr. Kodama.)*

(Eingegangen am 31. Januar 1928.)

Kürzlich haben Michaelis und sein Mitarbeiter (1925) "Die elektrische Ladung schwer löslicher Körper" untersucht. Dabei teilten sie die Kolloide in zwei Hauptgruppen: obligatorische und fakultative Kolloide ein.

Obligatorische Kolloide sind nach ihnen solche, welche, wie Mastix, immer nur in kolloider Form auftreten; fakultative dagegen die, welche, wie AgJ , ein ganz bestimmte, wenn auch geringe echte Löslichkeit haben.

Die Anionen des Mastix haben, so viel wir wissen, überhaupt nicht die Fähigkeit, sich in Wasser bis zu selbständigen, einzelnen Ionen zu dispergieren, seine Anionen bilden vielmehr immer nur einen Bestandteil einer Kolloidmizelle.

Dagegen ist das der Mizelle angehörige Kation in ionendisperser Form in Wasser existenzfähig. Das Anion ist das für die Kolloidebeschaffenheit verantwortliche Ion.

Der chemische Stoff, der es bildet, ist in dem betreffenden Lösungsmittel überhaupt nur in kolloider Form existenzfähig, wenn es überhaupt dispergiert ist. Anders liegt die Sache bei AgJ . Es sind so wohl das Ag -Ion wie das J -Ion ionendispers im Wasser existenzfähig, keinen von beiden ist allein für einen etwaigen kolloiden Zustand des AgJ verantwortlich, es gibt kein für den Kolloidzustand charakteristisches Ion, wie es bei Mastix der Fall ist.

Die kolloide Lösung ist eine Suspension von AgJ -Mizellen in einer echten, gesättigten Lösung von AgJ .

Die Untersuchungen über die fakultativen Kolloide begannen schon vor etwa 20 Jahren, als J. Duclaux mit den Kolloiden von Eisenhydroxyd Fe(OH)_3 arbeitete und feststellte, dass für die Stabilität dieser Kolloide die Existenz von Salzen, wie FeCl_3 nötig ist.

Er nannte diese nötigen Bestandteile "parties actives". Auch machte Jordis (1904) zur Aufklärung dieser Erscheinung Versuche mit Kieselsäure und Eisenhydroxyd, und zwar auf chemisch analytischem Wege, und konnte zeigen, dass die Elektrolyt-Verunreinigungen, die sich ohne Gefährdung des Hydrosolzustandes nicht entfernen lassen, nicht zufällige Verunreinigungen, sondern Bestandteile der Hydrosole von wesentlicher Bedeutung sind.

Die vielen Arbeiten von Lottermoser-Maffia (1910) und Pauli-Matula (1917) über Eisenhydroxydsolen, und besonders noch weitere Versuche von Lottermoser (1905–1910) zeigen deutlich, worauf der Einfluss der Fremdelektrolyte eigentlich beruht.

Lottermoser stellte AgJ-Solen her, indem er entweder eine verdünnte AgNO_3 -Lösung einer verdünnten KJ-Lösung zusetzte, oder umgekehrt in eine verdünnte AgNO_3 -Lösung KJ-Lösung fliessen liess.

Im ersten Falle war vor dem Erreichen des Punktes, in dem beide Stoffe in genau äquivalenter Menge vorhanden waren, KJ in Überschuss, im zweiten AgNO_3 .

Es zeigte sich nun, dass das ausgeschiedene fein verteilte AgJ nur kolloidgelöst bleibt, wenn KJ oder AgNO_3 in einem gewissen Überschuss vorhanden sind. Jedenfalls ist eine gewisse Menge von Fremdelektrolyten für die Beständigkeit der Sole notwendig.

Weiter bewährte sich bei der Verteilung eines Ions der wichtigen Fremdelektrolyte zwischen Mizellen (d. h. denen der fakultativen Kolloide) und intermizellarer Flüssigkeit in allen Fällen durchaus die gewöhnliche Adsorptions-Isotherme.

Man möchte daher vermuten, dass die Ionen gewisser

Fremdelektrolyte in irgendeiner Art von den Mizellen der Kolloide adsorbiert sind und wohl infolgedessen die Stabilität der Mizellen erhöhen können.

Die vorliegende Arbeit soll sich mit dem Einfluss gelöster Elektrolyte auf die Beständigkeit der fakultativen Kolloide beschäftigen.

Sie schliesst sich also direkt an die Arbeiten von Lottermoser¹⁾ an, der nicht nur die Adsorptionsbedingungen der Fremdelektrolyte an ungelöstem AgJ-Pulver, sondern überhaupt als erster die Kolloidbeständigkeit derselben untersucht hatte.

Zuerst könnte man denken, dass alle schwer, aber echt löslichen heteropolaren Pulver wenigstens einmal, kürzere oder längere Zeit, kolloidal bleiben müssen, wenn sie aus zwei entsprechenden Elektrolytlösungen entstehen. Dabei entsteht dann aber die Frage, ob sie fast momentan in schwer lösliche Niederschläge übergehen, oder ob sie lange Zeit kolloidbeständig bleiben.

Von diesem Standpunkt aus betrachtet gehören alle möglichen schwer, aber echt löslichen heteropolaren Pulver zu der Gruppe der fakultativen Kolloide.

Wie aber ein solches Pulver kolloidstabil bleiben kann, bleibt noch eine weitere Frage.

Aus den Momenten, welche die Kolloidstabilität solches Pulvers verursachen, muss man in erster Linie die Ladung desselben durch Adsorption der fremden Elektrolyte herausheben.

Befindet sich z. B. nach Lottermoser ungelöstes AgJ in einer Lösung von KJ, so adsorbiert es J-Ionen und ist negativ geladen. In einer Lösung von AgNO₃ adsorbiert es Ag-Ionen und ist positiv.

Die einfachste theoretische Vorstellung von der Herkunft dieser Adsorption bzw. Ladung ist folgende Annahme von Haber (1914). In dem Kristall des Elektrolyten werden die Ionen desselben durch elektrostatische Kräfte in einem Raumgitter zusammengehalten.

1) Lottermoser: loc. cit.

Jede Valenz z.B. in einem regulären Kristallgitter eines einwertigen Elektrolyten ist nach sechs Richtungen an den umgebenden Ionen entgegengesetzter Ladung zersplittert.

Infolgedessen haben die an der Oberfläche gelegenen Ionen des Kristalls nach aussen Rest-Valenzen frei. Ihre Anziehung auf entgegengesetzt geladene Ionen der Lösung erscheint als Adsorption.

Als Folge dieser Adsorption tritt die kolloidstabilisierende Ladung des Pulvers auf.

Befinden sich in der wässrigen Lösung fremde Elektrolyte, so können auch Ionenarten, welche nicht zum Kristallgitter gehören, adsorbiert werden, und zwar ist nach einer Regel von Paneth (1914) die Adsorption einer Ionen-Art umso stärker, je geringer die Löslichkeit des dadurch entstehenden Salzes ist. Diese Gesetzmässigkeit haben insbesondere Fajans (1913), Horovitz und Paneth (1915) für die Adsorption radioaktiver Ionen nachgewiesen.

Weitere Fälle, für die die Paneth'sche Regel gültig ist, wurden durch spätere Versuche von Michaelis und seinen Mitarbeiter mit verschiedenen schwer löslichen salinischen Pulvern beschrieben.

Im allgemeinen hängt also die Ladung eines schwer löslichen Pulvers von der Art und Konzentration der gelösten Elektrolyte ab, und zwar ist für die Aufladung des Pulvers nur die überschüssige Adsorption von positiven und negativen Ionen verantwortlich.

Ob aber allein die Ladung des Pulvers die Kolloidstabilität desselben beherrscht, oder wenn dies nicht der Fall sein sollte, inwieweit sie darauf einwirken kann, lässt sich bisher kaum sicher sagen.

Ich behauptete oben, dass alle möglichen schwer, aber echt löslichen heteropolaren Pulver zu der Gruppe der fakultativen Kolloide gehören müssten.

Von dieser Ansicht ausgehend habe ich in der folgenden Arbeit die Kolloidbeständigkeit von möglichst verschiedenen

schwer löslichen salinischen Pulvern, wie AgJ, AgCl, HgJ, PbCrO₄, Cu₂Fe(CN)₆, ThFe(CN)₆ us.w. bei ihrer Entstehung aus je zwei entsprechenden Lösungen untersucht. Und zwar wurden bei der Herstellung des Lösungsgemisches einerseits verschiedene ursprüngliche Konzentration der beiden Elektrolytlösungen und andererseits ein Überschuss bald von der einen, bald der anderen benützt.

VERSUCH I.

Erste Gruppe.

Zu dieser Gruppe gehören diejenigen Pulver, welche sowohl beim Überschuss von Kationen als auch bei dem von Anionen ganz beständige Kolloide bilden.

Hg-Oxalat.

(das Resultat nach 24 St. beobachtet)

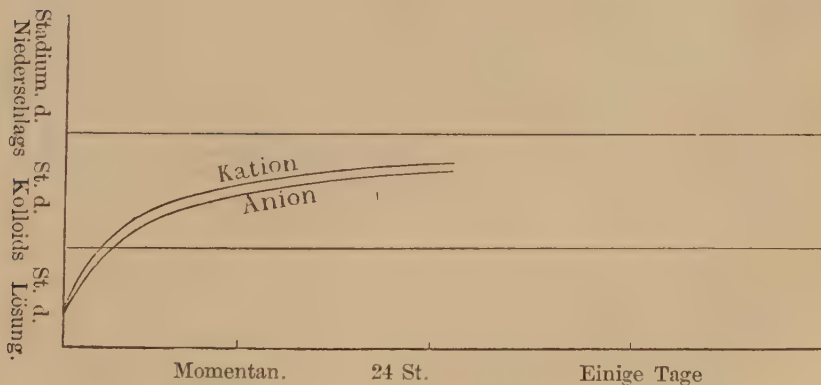
Überschuss.

N/100 Na-Oxalat	+ N/100 HgNO ₃	Hydrosol. (ein Teil Nd.)
N/200 "	+ N/200 "	" (Spur Nd.)
N/500 "	+ N/500 "	"

Überschuss.

N/100 HgNO ₃	+ N/100 Na-Oxalat	Hydrosol. (ein Teil Nd.)
N/200 "	+ N/200 "	" (Spur Nd.)
N/500 "	+ N/500 "	"

Fig. 1.



Zweite Gruppe.

Diese enthält diejenigen Pulver, welche beim Überschuss der einen Ionenart (d. h. Kationen oder Anionen) ganz beständig, beim Überschuss der anderen etwas unbeständig bleiben.

Ag J.

Überschuss

1) N/25 KJ	+	N/25 AgNO ₃Hydrosol. (beständig)
N/50 KJ	+	N/50 AgNO ₃ " "
N/100 KJ	+	N/100 AgNO ₃ " "
N/200 KJ	+	N/200 AgNO ₃ " "
2) Überschuss			
N/25 AgNO ₃	+	N/25 KJHydrosol. (ein Teil Nd.)
N/50 "	+	N/50 " " "
N/100 "	+	N/100 " " "
N/200 "	+	N/200 "Hydrosol. (beständig)

Hg J.

1) Überschuss			
N/100 KJ	+	N/100 HgNO ₃Hydrosol. (beständig)
N/200 "	+	N/200 " " "
2) Überschuss			
N/100 HgNO ₃	+	N/100 KJHydrosol. (zum Teil Nd.)
N/200 "	+	N/200 " " "

PbCrO₄

1) Überschuss			
N/100 K ₂ CrO ₄	+	N/100 Pb(NO ₃) ₂Hydrosol. (beständig)
N/200 "	+	N/200 " " "
2) Überschuss			
N/100 Pb(NO ₃) ₂	+	N/100 K ₂ CrO ₄Hydrosol. (ein Teil Nd.)
N/200 "	+	N/200 "Hydrosol. (Spur Nd.)

CuCrO₄

1) Überschuss			(Result at Nach 24st.)
N/100 K ₂ CrO ₄	+	N/100 CuCl ₂Hydrosol. (beständig)
N/200 "	+	N/200 " " "
2) Überschuss			
N/100 CuCl ₂	+	N/200 K ₂ CrO ₄Hydrosol. (ein Teil Nd.)
N/200 "	+	N/200 " " (Spur Nd.)

ThFe (CN)₆

1) Überschuss

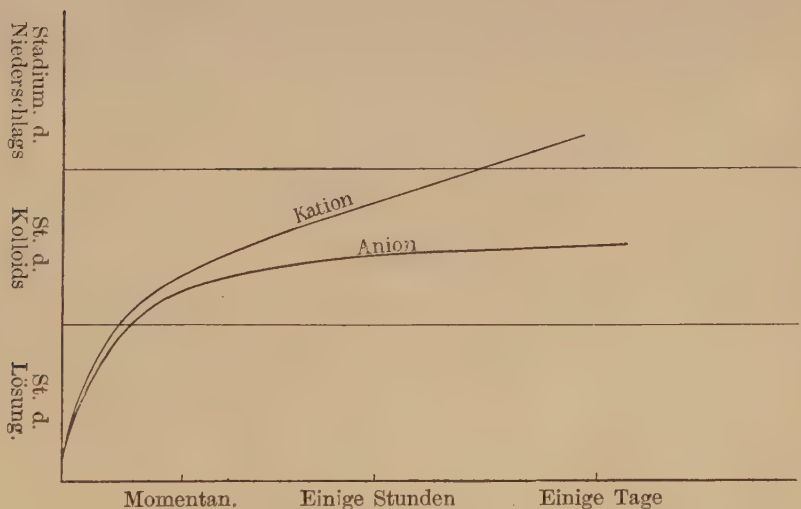
N/10	Th(NO ₃) ₄	+	N/10	K ₄ Fe(CN) ₆	Hydrosol. (beständig)	
N/25	"	+	N/25	"	"
N/50	"	+	N/50	"	"
N/100	"	+	N/100	"	"
N/200	"	+	N/200	"	"

2) Überschuss

N/25	K ₄ Fe(CN) ₆	+	N/25	Th(NO ₃) ₄	Hydrosol. (Nach 10 Minuten alle Nd.)
N/50	"	+	N/50	"	Hydrosol. (Nach 30 Minuten alle Nd.)
N/100	"	+	N/100	"	Hydrosol. (ein Teil Nd.)
N/100	"	+	N/200	"	" (spurweise Nd.)

Bemerkenswert ist es, dass nur Thoriumferrocyanat beim Überschuss von Kationen ganz beständig ist, während alle anderen dabei unbeständig sind.

Fig. II.



Dritte Gruppe.

Berlinerblau

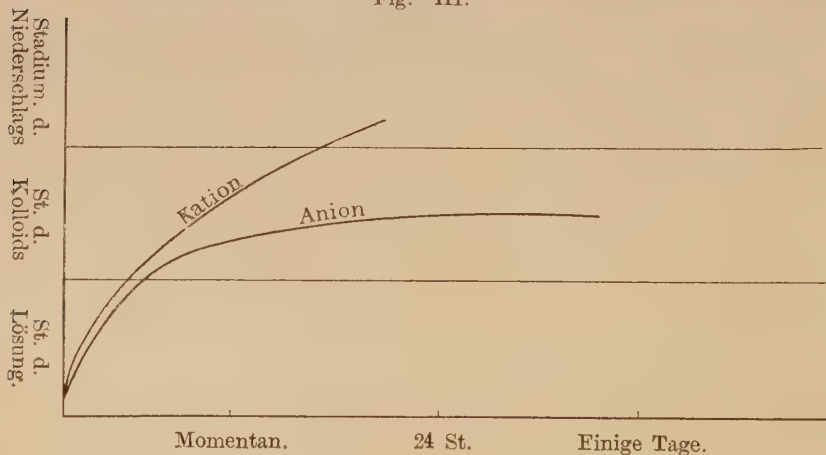
- 1) Überschuss
 N/50 $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ + N/50 FeCl_3 Hydrosol. (ein Teil Nd.)
 N/100 " + N/100 " Hydrosol. (beständig).
 N/200 " + N/200 " " "
- 2) Überschuss
 N/50 FeCl_3 + N/50 $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ Hydrosol. (Nach einigen
 Stunden Flockung)
 N/100 " + N/100 " " (fast total Nd.)
 N/200 " + N/200 " " (ein Teil Nd.)

Ferrocyan-Cupper

- 1) Überschuss
 N/50 $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ + N/50 CuCl_2 Hydrosol. (Spur Nd.)
 N/100 " + N/100 " " (beständig)
 N/200 " + N/200 " " "
- 2) Überschuss
 N/50 CuCl_2 + N/50 $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ Hydrosol. (Nach 2 St fast
 alle Nd.)
 N/100 " + N/100 " " "
 N/200 " + N/200 " " (ein Teil Nd.)

Hier ist besonders zu betonen, dass die Kolloide dieser Gruppe, ebenso wie die Mehrzahl derjenigen der zweiten, beim

Fig. III.



Überschuss von Anionen ganz auffällig beständiger sind als bei dem von Kationen.

Vierte Gruppe.

In diese Gruppe ordnete ich diejenigen, welche sowohl beim Überschuss von Kationen als auch bei dem von Anionen nach wenigen Minuten Niederschläge bilden.

Ca-Oxalat.

1) Überschuss				
N/10	K ₂ -Oxalat	+	N/10	CaCl ₂Nd.
N/100	"	+	N/100	"Nd.
N/500	"	+	N/500	"Nd.
2) Überschuss				
N/10	CaCl ₂	+	N/10	K ₂ -OxalatNd.
N/100	"	+	N/100	"Nd.
N/500	"	+	N/500	"Nd.

BaSO₄

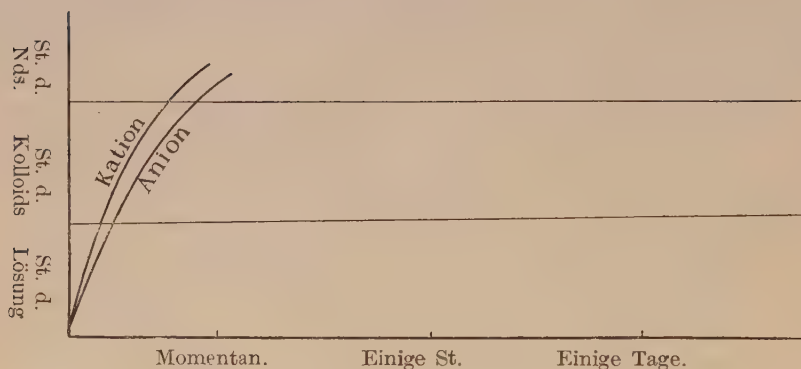
1) Überschuss				
N/10	Na ₂ SO ₄	+	N/10	NaCl ₂Nd.
N/100	"	+	N/100	"Nd.
N/500	"	+	N/500	"Nd.
2) Überschuss				
N/10	BaCl ₂	+	N/10	Na ₂ SO ₄Nd.
N/100	"	+	N/100	"Nd.
N/500	"	+	N/500	"Nd.

Ba CrO₄

1) Überschuss				
N/50	K ₂ CrO ₄	+	N/50	BaCl ₂Nd.
N/100	"	+	N/100	"Nd.
N/500	"	+	N/500	"Nd.
2) Überschuss				
N/50	BaCl ₂	+	N/50	K ₂ CrO ₄Nd.
N/100	"	+	N/100	"Nd.
N/500	"	+	N/500	"Nd.

Nur bei BaCrO₄ tritt die Bildung der Niederschläge beim Überschuss von Anionen etwas später auf, als bei dem von Kationen.

Fig. IV.

*Fünfte Gruppe.*

Diese Gruppe nimmt den obigen gegenüber eine besondere Stellung ein und enthält diejenigen, welche anfangs eine ganz wasserklare Lösung bilden, die aber etwa nach 24 Stunden allmählich opaleszent wird und dann nach 3-4 Tagen in Niederschläge übergeht. Der Unterschied zwischen den Überschüssen von Kationen und Anionen ist hier nicht zu bemerken.

Nur insofern zeigt diese Gruppe einen Zusammenhang mit der ersten, als der Unterschied zwischen den Überschüssen von Kationen und Anionen nicht bemerkbar ist.

Aluminiumferrocyanid.

1) Überschuss			Nach 1 Tage	Nach 3 Tagen
N/25 AlCl_3	+	N/25 $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$..wasserklar.	Opalesz. Nd.
N/50 "	+	N/50 "	"	" "
N/100 "	+	N/100 "	"	" "
2) Überschuss			Nach 1 Tage	Nach 3 Tagen
N/25 $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$	+	N/25 AlCl_3	wasserklar.	Opalesz. Nd.
N/50 "	+	N/50 "	"	" "
N/100 "	+	N/100 "	"	" "

Aluminiumferricyanid.

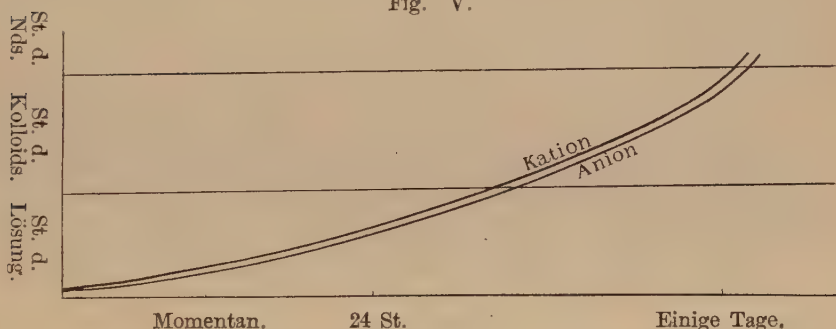
1) Überschuss			Nach 1 Tage	Nach 3 Tagen
N/50 AlCl_3	+	N/50 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$..wasserklar.	Opalesz. Nd.
N/100 "	+	N/100 "	"	" "

2) Überschuss	Nach 1 Tage	Nach 3 Tagen
N/50 $K_3Fe(CN)_6$ + N/50 $AlCl_3$	wasserklar.	Opalesz. Nd.
N/100 " + N/100 "	"	" "

Thoriumferricyanid.

1) Überschuss	Nach 1 Tage	Nach 3 Tagen
N/25 $Th(NO_3)_4$ + N/25 $K_3Fe(CN)_6$	wasserklar.	Opalesz. Nd.
N/50 " + N/50 "	"	" "
N/100 " + N/100 "	"	" "
2) Überschuss	Nach 1 Tage	Nach 3 Tagen
N/25 $K_3Fe(CN)_6$ + N/25 $Th(NO_3)_4$...	wasserklar.	Opalesz. Nd.
N/50 " + N/50 "	"	" "
N/100 " + N/100 "	"	" "

Fig. V.



Graphische Darstellung:

Alle obigen Resultate lassen sich graphisch auf eine einzige Weise darstellen.

Die Bildung der Kolloide aus beiden Elektrolytlösungen und ihre weitere Zustandsänderung in die Niederschläge müssen immer kontinuierlich sein. Man kann bei dieser kontinuierlichen Zustandsänderung zweckmässig drei Stadien unterscheiden; das Stadium der Lösung, des Kolloids und des Niederschlags.

Bei jenen Kolloiden, welche längere Zeit beständig bleiben, handelt es sich nicht etwa um eine dauernd konstante Beschaffenheit derselben, sondern um eine ganz langsame Veränderung in der Richtung nach Niederschlägen, weil es zum Wesen der Kolloide im allgemeinen gehört, dass sie in der Richtung einer

Oberflächenverkleinerung beständig Veränderungen in der Lösung erfahren, kurz, dass sie altern.

Aus demselben Grunde kann man behaupten, dass auch bei jenen Substanzen, wie BaSO_4 und BaCrO_4 , das Stadium des Kolloids zwar nicht entbehrt werden kann, aber doch plötzlich in das des Niederschlags übergeht.

Endlich verlaufen bei den Kolloiden der fünften Gruppe die Kurven der Zustandsänderung ziemlich langsam von der Lösung zum Kolloide und vom Kolloide zum Niederschlag, ohne jedoch irgendwo besonders lange zu verweilen.

Wenn man diese Zustandsänderungen nach einzelnen Gruppen graphisch darstellt, so erhält man solche Kurven, wie sie in Fig. I-V gegeben sind.

VERSUCH II.

Wenn die Ladung der obigen Kolloide das Hauptagens zur Stabilisierung derselben sein soll, so muss man ohne weiteres erwarten, dass die unbeständigeren Kolloide weniger geladen sind, als die beständigeren.

Um diese Frage zu entscheiden, bestimmte ich auf elektroendosmotischem Wege die Ladungsmasse einiger der entstandenen Pulver.

Methodik der Elektroendosmose.

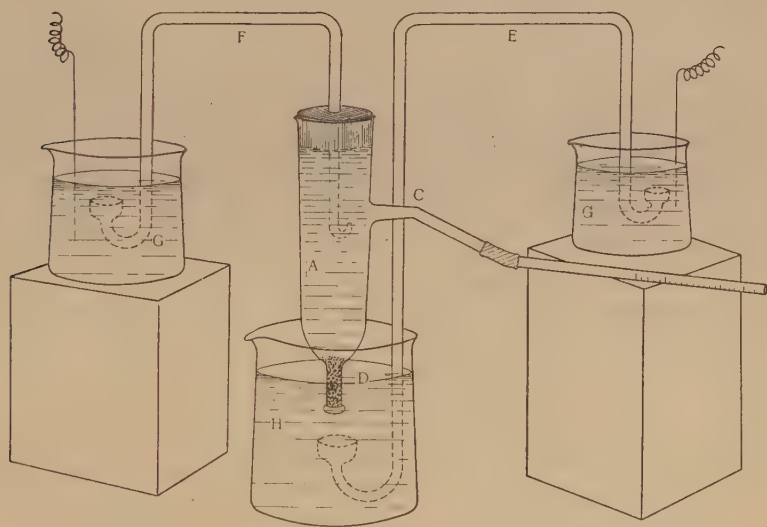
Zuerst wurde eine ganze Menge Thoriumferrocyanat und Kupferferrocyanat aus je beiden entsprechenden Elektrolytlösungen von äquivalentem Mengen-Verhältnisse dargestellt. Die entstandenen Niederschläge wurden wiederholt mit destilliertem Wasser gewaschen, bis keine fremden Ionen nachweisbar waren, im Exsiccator getrocknet und dann fein zerrieben.

Der in unserem Laboratorium verwendete Apparat ist schon von Umetsu (1923) beschrieben worden, welcher ihn für Versuche mit Kohlenpulver verwendet hat. Das zu untersuchende Pulver wird zunächst mit einem grossen Überschuss der Elektrolytlösung, in welcher, es später untersucht werden

soll, durchgeschüttelt.

Der Überschuss der Lösung muss so gross sein, dass ihre Konzentration an Elektrolyten durch die Adsorption nicht messbar verändert wird (0.3 gr Pulver in 250 ccm Lösung). Am nächsten Tage wird das sedimentierte Pulver in den Apparat auf folgende Weise eingeführt. Das untere Ende des Glaszylinders wird mit Gaze umbunden, die das Pulver enthaltende Lösung in das offene Rohr von oben eingegossen und mit Hilfe einer Saugpumpe abfiltriert. Das Pulver sammelt sich in den Röhrechen in Form einer dichten Säule an, welche später das Diaphragma darstellen soll.

Fig. VI.



Sobald es die Festigkeit der Säule zulässt, wird die Gaze abgenommen und die Bildung der Säule durch weiteres Aufgiessen und Saugen vervollständigt. Dann erst wird das Glasrohr entsprechend der Zeichnung in den ganzen Apparat eingesetzt. Zum Füllen des unteren Becherglases (H) und des noch freien Teils von (A) wird die abfiltrierte Flüssigkeit benützt. Die

Stütze (c) dient dazu, um durch Ansaugen von (d) die definitive luftblasenfreie Füllung zu ermöglichen.

Der Strom wird mit Hilfe zweier nicht zu enger Glasrohre (e) und (f) zugeführt, welche mit KCl gesättigter 3 prozentiger Agargallerte gefüllt sind. Diese Rohre tauchen anderseits in eine 10 prozentige Kupfersulfatlösung (g), welche Kupferelektroden enthält. In der Regel wurde eine Spannung von 100 Volt angelegt. Als Steigrohr diente eine beinahe horizontal liegende fast kapillare Pipette, welche in 0.001 ccm graduirt ist. Nach dem die hydrostatischen Niveauänderungen zum Stillstand gekommen sind, wird der Strom geschlossen und die Bewegung des Meniskus im Steigrohr beobachtet. Nach $\frac{1}{2}$ Minute wird der Strom gewendet und dieses mehrfach wiederholt. Die Ausschläge des Niveaus beim Wenden waren ziemlich symmetrisch, jedoch nicht vollkommen. Die wahre endosmotische Verschiebung erhalten wir, wenn wir aus den Ablesungen nach mehreren Stromwendungen das Mittel nehmen.

Da der Spannungsabfall pro Zentimeter stets der gleiche ist und der Gesamtquerschnitt der Poren bei einer bestimmten Pulverart einigermassen konstant ausfallen muss, so ist nach der Helmholtz'schen Formel für eine bestimmte Pulverart unabhängig von der Art der Elektrolytlösung der endosmotische Ausschlag ein angenähertes relatives Mass für den Potentialunterschied der Teilchen gegen die Lösung.

Resultat der Elektroendosmose.

(Spannung genau 100 Volt. Temperatur 25°C)

I. Thoriumferrocyanatpulver.

Elektrolytlösung		
	aq. dest.	$\pm 0.$
a)	N/1000 Th(NO ₃) ₄	+0.0059
	N/500 "	+0.0112
	N/100 "	+0.0153
	N/50 "	+0.0130
	N/25 "	+0.0123

b)	N/1000	$K_4Fe(CN)_6$	-0.0055
	N/500	"	-0.0056
	N/100	"	-0.0060
	N/50	"	-0.0059
	N/50	"	-0.0091

II. Kupferferrocyanatpulver.

a)	N/50	$CuSO_4$	+0.0090
	N/100	"	+0.0082
	N/200	"	+0.0067
b)	N/50	$K_4Fe(CN)_6$	-0.010
	N/100	"	-0.0080
	N/200	"	-0.0065

Die Zahlen hier bedeuten die pro $2\frac{1}{2}$ Minuten transponierte Wassermenge im ccm. Das Vorzeichen zeigt die Ladung des Pulvers gegen die Lösung an.

Hier achte man besonders darauf, dass bei Kupferferrocyanat die entstandenen Kolloide beim Überschuss von Kationen ganz unbeständig und beim Überschuss von Anionen dagegen ganz beständig sind, während hier die Pulver nach dem Resultate der Elektroendosmose in beiden Fälle fast gleich stark geladen sind.

Nach diesem Resultate scheint das Ladungsmass des Teilchens wenigstens nicht der einzig bedingende Faktor der Stabilität desselben zu sein.

SCHLUSSBETRACHTUNG.

1. Alle sehr schwer, aber echt löslichen heteropolaren Pulver lassen sich zusammen in die Gruppe der fakultativen Kolloide nach Michaelis einordnen, und die Zustandsänderung derselben von Lösung zu Kolloid und von Kolloid zu Niederschlag graphisch auch auf die gleiche Weise darstellen, nur die Geschwindigkeiten derselben unterscheiden sich je nach den Arten der Pulver und bei den einzelnen Pulvern je nach dem Stadium ihrer Zustandsänderung.

2. Zur Stabilisierung des Pulvers muss die Ladung natürlich in erster Linie als unentbehrlich gedacht werden. Doch

die Resultate der Elektroendosmose gestatten nicht zu behaupten, dass die Ladung einzig und allein ausschlaggebend sei.

3. Wir haben gesehen, dass die entstehenden Kolloide fast immer beim Überschuss von Anionen beständiger sind, als bei dem von Kationen. Auch Lottermoser hat schon bemerkt, dass AgJ-Hydrosol beständiger ist beim Überschuss von KJ-Lösung, als bei dem von AgNO₃-Lösung. Er wollte die Ursache dieser Erscheinung darin erblicken, dass an den überschüssigen, adsorbierten J-Ionen unter sieben Valenzen immer sechs nach aussen frei bleiben, während die im Überschuss adsorbierten Ag-Ionen eigentlich nur drei Valenzen und nur zwei davon nach aussen frei haben.

Diese Erklärungsweise lässt sich bei mir nicht mehr auf die so verschiedenen Arten von Pulvern übertragen. Vielmehr scheint es mir weit richtiger zu sein, die Erklärung direkt in der Tatsache zu suchen, dass fast immer gerade beim Überschuss von Anionen die Pulver als Kolloide stabiler sind.

Überlegt man einmal, dass die Stabilitätsbedingungen beim hydrophilen und hydrophoben Kolloide sich graduell unterscheiden, so kann die Hydratation des Kolloide, die beim hydrophilen Kolloide eine so wichtige Rolle spielt, auch beim hydrophoben, womit wir uns jetzt beschäftigen, nicht ohne Bedeutung sein.

Wenn man wie gewöhnlich annehmen könnte, dass die Anionen im allgemeinen stärker hydratisiert seien als die Kationen, so sollten die im Überschuss adsorbierten Anionen der Kolloide mehr Hydratation mit sich bringen als bei der überschüssigen Adsorption von Kationen, infolgedessen würden die Kolloide in dem ersten Falle beständiger sein als im letzten.

Herrn Prof. Michaelis, dessen wertvolle Leitung mir bei dieser Arbeit zu Diensten stand, sei an dieser Stelle meinen herzlichsten Dank ausgesprochen.

LITERATUR.

- Duclaux (1907): J. Chem. Phys. **5**, 29-56.
 Fajans (1913): Ber. d. deut. chem. Ges. **46**, 3486.
 Haber (1914): Zeitschr. f. Elektrochem. **20**, 521.
 Horonitz u. Paneth (1915): Zeitschr. f. Phys. Chem. **89**, 513.
 Jordis (1904): Sitzungsber. d. phys-med. Soz. Erlangen, **36**, 47-107.
 Lottermoser u. Maffia (1910): Ber. d. deut. Chem.⁹ Ges. **43**, 3613.
 Lottermoser (1905: J. f. prak. Chem. **72**, 39.
 ——— (1906). " " " **73**.
 ——— (1907). Zeitschr. f. phys. Chem. **60**, 451.
 ——— (1908). " " **61**.
 Maffia (1911): koll. Beih. **3**, 85.
 Michaelis, L. u. S. Dokan 1925; Kolloid. Zeitschr. **37**.
 Paneth (1915): Physk. Z. **15**, 924 (1914) Zeitschr. f. Physik. chem. **89**.
 Pauli u. Matula (1917): Koll. Zeitschr. **21**, 49.
 K. Umetsu (1923): Bioch. Zeitschr. **135**, 442.

STUDIES ON EXPERIMENTAL RICKETS.

I. On the Antirachitic Property of Crude "Biosterin," The Cholesterin-free, Unsaponifiable Fraction of Cod Liver Oil.

By

SEIICHI IZUME AND ISAO KOMATSUBABA.

*(From the Central Laboratory of the South Manchuria
Railway Co., Dairen, Manchuria.)*

(Received for publication, February 10, 1928.)

INTRODUCTION.

Since Mellanby (1919) demonstrated that the rickets in puppies and in children were prevented by the administration of cod liver oil the antirachitic property of cod liver oil was repeatedly confirmed by a number of investigators.

Zucker, Pappenheimer and Barnett (1921) and Zucker (1922) were able to show that the active principle in cod liver oil was resistant to hydrolysis by a strong alkali and concentrated in the non-saponifiable fraction of the oil. Similar results were also obtained by Steenbock, Jones and Hart (1923), Dubin and Funk (1923), Wilkins and Kramer (1927) and others. Dorlencourt, Debray and Spanien (1926) reported, however, that the rickets in rats were not always cured by the administration of the unsaponifiable portion of cod liver oil, prepared by their method or that obtained on the market while the original cod liver oil was potent in its antirachitic activity.

Nelson and Steenbock (1925) investigated further into the localization of the active substance in the unsaponifiable constituents of cod liver oil and found it to be present in the fraction not precipitated by digitonin. Kramer, Kramer, Shelling and Shear (1927) were also successful in curing experimental rickets in rats by injecting the ether solution of the cholesterin-free fraction of cod liver oil.

In the present investigation the authors were primarily interested in studying whether the antirachitic principle or vitamin D in cod liver oil can be concentrated without any appreciable loss, as in the case of vitamin A, in the cholesterol-free, non-saponifiable fraction, provided the procedure introduced by Takahashi (1922) for the preparation of crude "biosterin" is adopted. Although the antiophthalmic and growth-promoting properties of the preparation were carefully examined by these investigators and others, no report on its antirachitic factor has yet been published so far as we know.

The crude "biosterin" prepared in the authors' laboratory according to the direction of Takahashi and his coworkers as well as the technical "biosterin" preparation supplied by the Institute of Physical and Chemical Research were tested for the antirachitic activity.

EXPERIMENTAL.

Young rats weighing between 35 and 50 gm. were usually placed on the Steenbock diet No. 2965⁽¹⁾ (1925) and sometimes on the Sherman-Pappenheimer ration No. 84 (1921) for a period of about six weeks. During that period the rachitic lesions in the tibia were almost regularly observed the extent of which was judged by the radiographic films. The test material was either incorporated with the diet or administered daily to each individual rat in a solution of olive oil, measured by means of a pipette. At the extirpation of the test period which lasted for about three weeks other radiographs were taken and the blood of the animals was often analysed for the content of inorganic phosphorus. To draw a desirable amount of blood the animals were anesthetized with chloroform and the cardiac puncture was made with a syringe. The inorganic phosphorus content of the plasma was determined colorimetrically by the method of Benedict and Theis (1924). We relied on the radiological diagnosis

⁽¹⁾ In preparing the diet we use "Yakifu," a commercial wheat gluten product, instead of wheat gluten prescribed for the diet.

as well as on the estimation of the inorganic phosphorus content of the plasma to judge the degree of calcification in the rachitic lesions induced by feeding of the test material.

For the preparation of crude "biosterin" the method of Takahashi and his coworkers (1923) was slightly modified in the following way:

500 gm. of cod liver oil were boiled for an hour with a litre of a 20 per cent solution of potassium hydroxide in alcohol. The saponification product was poured into an excess of calcium chloride in alcohol. The precipitate of calcium soap thus formed was separated from the alcoholic solution of unsaponifiable matter. The filtrate was saturated with carbon dioxide gas to remove the excess of calcium chloride in the form of insoluble calcium carbonate and the solution was evaporated under diminished pressure. The residue was shaken with ether to transfer the unsaponifiable fraction into the ether solution. The solution was evaporated to dryness. The product thus obtained still contained a small amount of oil remaining unsaponified, and, therefore, it was again saponified using 500 cc. of 5 per cent alcoholic potash. The reaction product was treated in the same way as the above in order to remove nearly all the fatty acids and glycerin from the unsaponifiable portion.

To remove cholesterol the fraction was previously estimated for the content of cholesterol by the digitonin method of Windaus, and a little over the calculated amount of digitonin (Merck) in a 1 per cent solution in 90 per cent alcohol was added to the hot solution of the product in 95 per cent alcohol. After standing over night in an ice box the solution was filtered and evaporated to dryness in vacuum. The residue was dissolved in ether and washed with water repeatedly to remove the small excess of digitonin. The ether solution was dehydrated with anhydrous sodium sulphate and evaporated to dryness.

The crude "biosterin" thus prepared was of dark brown color and almost free from cholesterol. The yield was about 0.1 per cent of the cod liver oil used. For the feeding experiments

TABLE

Rat No.	Rachitic diet	Rachitic period	Test period	Test material
		day	day	
AM 02	Steenbock	45	23	The diet alone (control)
AO 21	"	45	23	"
U 00a	"	43	23	Diet plus 10% olive oil
W 02	"	43	23	Diet plus 20% olive oil
W 10	"	43	23	"
G 00	"	38	21	Diet plus 2% cod liver oil
G 20	"	38	21	"
AD 12	"	41	21	0.3 cc. of cod liver oil daily.
AD 21	"	41	21	"
I 02a	"	45	23	0.1 cc. of cod liver oil daily.
I 10a	"	45	23	"
U 11a	"	45	23	2 gms. of 0.1% solution of crude "biosterin" in olive oil added per 100 gms. of the diet.
O 00a	"	45	23	"
AG 20	"	44	22	0.3 cc. of 0.1% solution of crude "biosterin" daily.
AG 11	"	44	22	"
AG 12	"	44	22	0.1 cc. of 0.1% solution of crude "biosterin" daily.
AG 21	"	44	22	"
AH 01	"	44	22	0.05 cc. of 0.1% solution of crude "biosterin" daily.
AH 21	"	44	22	"
G 02	"	38	21	Diet plus 0.2% "Riken vitamin A"
G 12	"	38	21	"
AD 00	"	41	21	0.3 cc. of 10% solution of "Riken vitamin A" in olive oil, daily.
AD 01	"	41	21	"
AD 02a	"	41	21	0.05 cc. of 10% solution of "Riken vitamin A" daily.
AD 10a	"	41	21	"
X 00	Sherman-Pappenheimer	40	23	The diet alone (control)
X 10	"	40	23	"
X 01	"	40	23	Diet plus 0.5% "Riken vitamin A"
X 02	"	40	23	"

I.

Weight			Radiographic findings at the end of		Plasma Phosphorus
Initial	Experimental	Final	Rachitic period	Test period	
gm.	gm.	gm.			mg. per 100 cc
39.0	63.5	72.0	Moderate rickets	No healing	1.67
34.0	64.5	67.0	Marked rickets	"	—
47.5	97.0	105.0	Slight rickets	"	1.03
42.0	65.0	71.5	Moderate rickets	"	—
58.5	88.0	92.0	"	Slight healing	—
50.0	64.5	63.0	"	Complete healing	—
50.0	65.5	64.0	"	"	—
44.0	72.5	87.0	"	"	—
39.0	63.0	63.0	"	"	3.02
48.0	82.0	86.5	Marked rickets	Advanced healing	—
38.0	77.5	84.0	Moderate rickets	Complete healing	3.78
58.0	115.5	126.5	Slight rickets	"	—
48.5	87.0	91.0	Moderate rickets	"	—
45.0	92.0	107.0	Marked rickets	Advanced healing	3.80
40.5	59.5	59.5	"	"	—
37.5	71.0	76.5	Moderate rickets	"	—
36.5	66.0	76.0	Marked rickets	Complete healing	—
41.0	72.0	78.0	"	Advanced healing	—
37.0	75.0	82.5	Moderate rickets	Complete healing	3.05
47.5	56.5	63.0	"	"	—
45.0	66.5	74.5	"	"	—
46.0	78.5	90.0	"	"	3.05
51.0	87.5	99.5	"	"	—
43.0	75.0	90.5	"	"	3.66
33.5	75.0	90.0	"	"	3.42
41.5	62.0	68.5	Marked rickets	No healing	1.45
36.0	41.5	47.0	"	"	—
39.5	62.5	67.0	"	Advanced healing	2.17
38.0	47.0	49.0	Moderate rickets	"	2.23

0.1 per cent solution of the preparation in olive oil was usually employed, one cc. of the solution being equivalent to about one cc. of the original cod liver oil.

The technical "biosterin" preparation of the Institute of Physical and Chemical Research which was produced by some modifications of Takahashi's method is identified by its trade name of "Riken vitamin A." One cc. of the preparation is claimed to be as potent as 10 cc. of cod liver oil. The preparation we used for this work was, however, not free from cholesterin.

The experimental results are tabulated in the accompanying table. As shown in the table, the addition of cod liver oil at 2 per cent of the diet or the daily administration of 0.1 or 0.3 cc. of the oil to each rat always produced healing in rachitic lesions, while olive oil incorporated with the diet even at 20 per cent had little effect.

The antirachitic potency of the crude "biosterin" we prepared was found to be exceedingly great. The incorporation of 0.1 per cent solution of crude "biosterin" in olive oil as two per cent of the diet as well as the daily doses between 0.05 and 0.3 cc. per rat always brought about calcification in rachitic lesions. It may be seen from these facts that as little as 0.05 mg. of crude "biosterin" per day per rat was still an effective dose. No further attempt to determine the minimum effective dose of the preparation was, however, made.

The table also indicates that the technical "biosterin" preparation of the Institute of Physical and Chemical Research was equally potent in its antirachitic property, the daily administration of 0.05 cc. of its 10 per cent olive oil solution to each rat being effective in the action.

DISCUSSION.

The experimental facts obtained by the authors that the antirachitic principle of cod liver oil was concentrated in the cholesterin-free, nonsaponifiable fraction without being destroyed by alkaline

saponification or precipitated by digitonin are in harmony with those of Nelson and Steenbock (1925) and Kramer, Kramer, Shelling and Shear (1927). We believe, however, the active principle can be more advantageously concentrated by the saponification method of Takahashi (1922) than any others previously reported.

To concentrate the antirachitic substance of cod liver oil Zucker (1922) employed the following method: Cod liver oil was extracted with 95 per cent alcohol, and the extract was saponified with sodium hydroxide. The aqueous solution of saponification products was treated with calcium chloride to precipitate out calcium soaps together with unsaponifiable matter. The precipitate was dried and extracted with acetone. Dubin and Funk (1923) and Dubin (1925) first extracted the oil with organic acids and saponified the extract with alcoholic potash. The soaps were dried and extracted with ether to obtain the unsaponifiable fraction. Nelson and Steenbock (1925) saponified cod liver oil with alcoholic potash and after diluting with water extracted the unsaponifiable matter with ether. The procedure of Takahashi in which nearly all the fatty acids liberated by saponification are removed in the form of relatively insoluble calcium soaps from the alcoholic solution of unsaponifiable fraction and no tedious process of extraction is included seems to be more conveniently carried out than those methods above mentioned.

SUMMARY.

The antirachitic principle in cod liver oil was proved to be resistant to alkaline saponification and non-precipitable by digitonin. The principle was advantageously concentrated, provided the Takahashi's technique of saponification was followed. The cholesterol-free, unsaponifiable fraction of cod liver oil or the so-called, crude "biosterin" of Takahashi was shown to be exceedingly potent in the antirachitic activity, the daily administration of doses as little as 0.05 mg. per rat being sufficient to produce a constant healing in experimental rickets.

The technical "biosterin" preparation of the Institute of the Physical and Chemical Research which is identified by "Riken" was also found to contain a considerable amount of vitamin D, the antirachitic principle, besides vitamin A, the growth-promoting and antiophthalmic factors.

We wish to acknowledge our gratitude to Prof. U. Suzuki who suggested this research to us and also to Mr. T. Fujimoto of the Dairen Hospital for his kind help in making the large number of radiographs necessary for this work.

REFERENCES.

- Benedict, S. R. and Theis, R. C., (1924): *J. Biol. Chem.*, **61**, 63.
Dorlencourt, H., Debray, J. and Spanien, E., (1926): *Compt. rend. soc. biol.* **95**, 367.
Dubin, H. E., (1925): *J. Am. Pharm. Assoc.*, **14**, 215.
Dubin, H. E. and Funk, C., (1923): *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **21**, 453; *J. Metabolic Research*, **4**, 467.
Kramer, B., Kramer, S. D., Shelling, D. H. and Shear, M. J. (1927): *J. Biol. Chem.*, **71**, 699.
Mellanby, E., (1919): *Lancet*, (i), 407; 1920 (i), 856.
Nelson, E. M. and Steenbock, H., J. (1925): *Biol. Chem.*, **64**, 299.
Steenbock, H. and Black, A., (1925): *J. Biol. Chem.*, **64**, 263.
Steenbock, H., Jones, J. H. and Hart, E. B., (1923): *J. Biol. Chem.* **58**, 383.
Takahashi, K., (1922): *J. Chem. Soc., Japan*, **43**, 828.
Takahashi, K. and Kawakami, K., (1923): *J. Chem. Soc. Japan*, **44**, 590.
Takahashi, K., Nakamiya, Z., Kawakami, K. and Kitasato, T., (1925): *Scientific papers of the Institute of Physical and Chemical Research*, **3**, 81.
Sherman, H. C. and Pappenheimer, A. M., (1921): *J. Exp. Med.*, **34**, 189.
Wilkins, L. and Kramer, B., (1927): *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, **40** 52.
Zucker, T. F., (1922): *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **20**, 136.
Zucker, T. F., Pappenheimer, A. M. and Barnett, M. (1921): *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **19**, 167.

PLATE I.

Fig. I. (a)



Fig. II. (a)



Fig. I. (b)

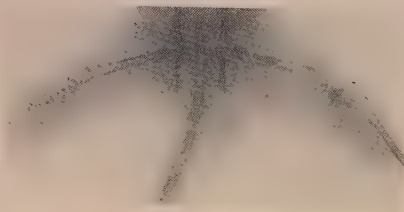


Fig. II. (b)



Fig. III. (a)



Fig. IV. (a)

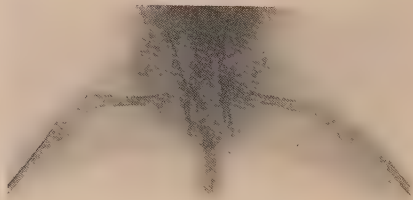


Fig. III. (b)

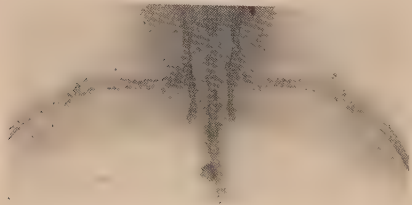
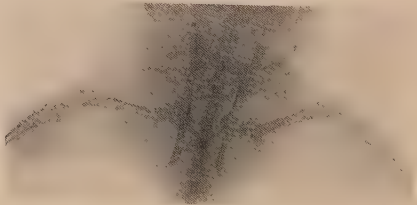


Fig. IV. (b)



EXPLANATION OF PLATE I.

Fig. III. (a). The radiograph of Rat (W. 02) placed on the semipurified diet for a period of six weeks, showing moderate rachitic lesions in the tibia (b), and (c). The bones of the hind legs were radiographed after six weeks on the same diet for three weeks, indicating little healing process taken place.

Fig. IV. Rat (AD 12) at the expiration of 10 weeks on the semipurified diet. The radiograph of the tibia (a) shows moderate rachitic lesions. The radiograph of the tibia (b) shows moderate rachitic lesions. The radiograph of the tibia (c) shows moderate rachitic lesions.

Fig. V. Rat (AD 10a) at the end of rachitic period (a), and of test period (b). The dose of 1000 units of vitamin A per day per rat was sufficient to induce calcification in rachitic bones.

Fig. IV. Rat (AD 10a) at the end of rachitic period (a), and of test period (b). The dose of 1000 units of vitamin A per day per rat was sufficient to induce calcification in rachitic bones.

Fig. II. (a)



Fig. II. (b)

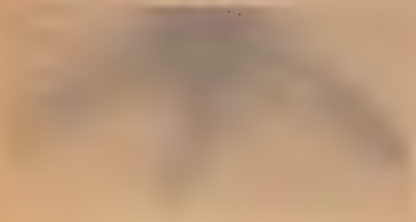


Fig. IV. (a)



Fig.

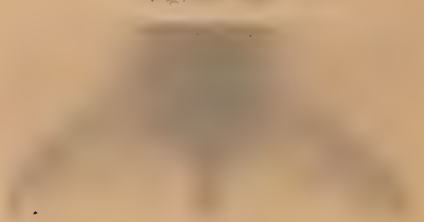
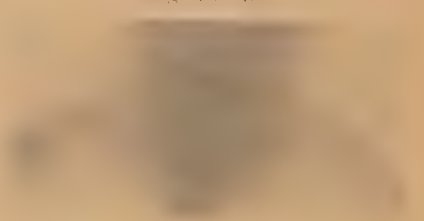


Fig. III. (b)



Fig. IV. (b)



EXPLANATION OF PLATE I.

Fig. I. (a), The radiograph of Rat (W. 02) placed on the Steenbock diet for a period of six weeks, showing moderate rachitic lesions in the tibia. (b), The tibia of the same rat after the feeding of olive oil at 20 per cent of the diet for three weeks, indicating little healing process taken place.

Fig. II. The same tibia of Rat (AD 12) at the extirpation of rachitic period (a), and of test period (b), showing that the daily administration of 0.3 cc. cod liver oil completely cured the rickets in three weeks.

Fig. III. The moderate rachitic changes (a) in the tibia of Rat (AH 21) was shown to be completely healed by the daily dose of 0.05 mg. crude "biosterin" (b).

Fig. IV. Rat (AD 10a) at the end of rachitic period (a), and of test period (b), indicating that the doses of 5 mg. of "Riken vitamin A" per day per rat was sufficient to induce calcification in rachitic bones.

HÄMOLYSE UND GLYKOLYSE.

VON

KATSUMASA NOSHI.

(Aus der II. Medizinischen Klinik der Medizinischen Akademie zu
Osaka. Direktor: Prof. Dr. S. Kozawa.)

(Eingegangen am 23. Februar 1928.)

M. Doyon und A. Morel (1903) haben hervorgehoben, dass das glykolytische Ferment des Blutes fast oder gar nicht in den Sera, sondern hauptsächlich in den Formelementen vorhanden ist und seine Wirkung nur unter den intakten Zuständen derselben, aber nicht im lackfarbenen Blut nachweisbar ist. Auch De Meyer (1910) hat konstatiert, dass die glykolytische Wirkung bei der Hämolyse durch destilliertes Wasser verloren geht, während sie bei dem Zusatz von für die Blutzellen unschädlichen Lösungen z. B. der Ringerschen Lösung oder der physiologischen Kochsalzlösung gar nicht gehindert wird. J. Edelmann (1912) hat erkannt, dass in dem durch Saponin hämolysierten, lackfarbenen Blut die glykolytische Fähigkeit nicht abnimmt. Nach P. Rona und A. Döblin (1911) hebt eine Hämolyse mittels Wasser die Glykolyse auf, aber P. Rona und F. Arnheim (1913) haben später ermittelt, dass trotz Hämolyse eine Glykolyse im Blut auftritt, falls Blutalkalescenz und Anwesenheit von Phosphat- oder Carbonat-Ion in hinreichender Menge durch Zusatz von Phosphatgemisch oder Bicarbonatlösung besorgt wird. H. Nishian, K. Hiruma und K. Fukushima (1921) haben früher bestätigt, dass das glykolytische Ferment des Blutes des Menschen, der Ziege und des Kaninchens sich nicht im Serum, sondern hauptsächlich in den Blutzellen befindet und nach vollständiger Hämolyse durch destilliertes Wasser noch gut wirksam ist, wenn das hämolysierte Blut durch Zufügung der doppelt-konzentrierten Ringerschen Lösung wieder in isotonischen Zustand zurückgebracht ist. Durch diese klar aufgestellten Beweise drückten

sie aus, dass für die glykolytische Fermentwirkung des Blutes die intakten Blutformelemente nicht notwendig sind, sondern die Wirkung noch gut im hämolysierten Zustand erhalten bleibt. Dagegen fand C. Aibara (1922), dass das durch Saponin hämolysierte Blut auch durch den Zusatz von Carbonat oder Phosphat keine Glykolyse zeigt. Ebenso teilte Y. Kawashima (1922, 1923) mit, dass die glykolytische Kraft des durch destilliertes Wasser, Erfrierung, Hämolysin oder Schlangengift hämolysierten Blutes je nach dem Grad der Hämolysen sich abschwächt, und bei vollkommener Hämolysen die Glykolyse vollständig aufgehoben wird.

Wie oben erwähnt, sind die Ergebnisse über die glykolytische Wirkung des hämolysierten Blutes untereinander ganz verschieden, sodass man noch keine festen Schlüsse ziehen darf.

Da alle Forscher, wie wir gesehen haben, niemals das glykolytische Ferment von den Formelementen abzutrennen gesucht haben, so habe ich mich auf Anregung von Prof. Dr. Kozawa damit beschäftigt, das glykolytische Ferment aus den Blutformelementen zu isolieren und durch die Bestimmung sowohl der Glucose als Substrat als auch der Milchsäure als Spaltungsprodukt die Wirksamkeit des isolierten Fermentes festzustellen.

VERSUCHSANORDNUNG.

Das durch die Herzpunktion mehrerer Kaninchen aseptisch gewonnene Blut wird mit sterilem, eiskaltem, isotonischem Zitratgemisch ($\text{pH}=7,7$) gemischt, um die Gerinnung zu hemmen; langsam zentrifugiert; die obenstehende Flüssigkeit sowie die darin suspendierten und über den Erythrozyten geschichteten Leukozyten gründlich entfernt, um Beimengung des von den Leukozyten herstammenden Fermentes auszuschalten. Die auf diese Weise gewonnenen Erythrozyten werden dann je nach Zweck noch 3–4 mal mit dem Zitratgemisch oder sterilem, eiskaltem, isotonischem Phosphatgemisch ($\text{pH}=7,7$) ausgewaschen.

Ein kleiner Teil der auf diese Weise gewonnenen Erythrozy-

ten wird zur Hämatkrit-Ausführung benutzt, und den Hauptteil bringt man in die 2fache Menge von eiskaltem Äther und mengt sie kräftig genug zusammen. Nach etwa 5 Minuten verwandelt sich das Gemisch in eine dunkelrote, halb-durchsichtige, syrupöse Masse. Nach der kräftigen Zentrifugierung dieses Gemenges kann man es in 3 Schichten separieren: nämlich in Ober-, Mittel- und Unterschicht.

Die Oberschicht:—farblose, ganz durchsichtige Flüssigkeit, wie Äther.

Die Mittelschicht:—weiche, leicht gelbliche Emulsion.

Die Unterschicht:—sehr dicke, bordeaux-rote, durchsichtige Flüssigkeit.

Die Mittelschicht wird nach Entfernung der Ober- und Unterschicht noch 3–4 mal mit Phosphat- oder Zitrat-Gemisch ausgewaschen, um sie von den ober- und unterschichtigen Substanzen zu befreien. Die Unterschicht wird wieder in ein anderes Zentrifugenglas aufgefangen und noch kräftiger zentrifugiert, dann gewinnt man als die obenstehende, eine von dem mikroskopischen Gebilde vollständig befreite, ganz durchsichtige, bordeaux-rote, dicke Flüssigkeit.

Die auf diese Weise gewonnene 3. d.h. Oberschicht, die ausgewaschene Mittelschicht und die nochmals zentrifugierte Unterschicht werden dann in Zimmertemperatur evakuiert, um den Äther abzdampfen. Dem Rückstand der Ober-resp. Mittelschicht werden gleiche Mengen der oben geschilderten Zitrat- oder Phosphatgemische wie beim Anfangsblute zugesetzt, dann wird noch steriler, isotonischer Traubenzucker hinzugefügt, um den Gehalt auf cä. 0,5 % zu erhöhen.

Nun werden die 3 Gemenge in Thermostate von 37° C. eingetaucht und digeriert.

Ich bestimmte den Zucker mittels der Hagedorn-Jensen'schen Methode (1923) und die Milchsäure mittels der Mendel-Goldscheider'schen Methode (1925).

Alle Versuche wurden streng aseptisch ausgeführt, indem man immer durch aerobe sowie anaerobe Impfprobe kontrolliert.

Nach Beendigung des Versuches wurde die Unterschicht mit einer vielfachen Menge isotonischen Zitrat- oder Phosphat-Gemisches verdünnt und energisch zentrifugiert, dann prüfte man, ob etwa mikroskopische Gebilde noch sedimentierten. Fälle, deren Impfprobe ein positives Resultat ergaben, oder wo mikroskopische Gebilde noch in der Unterschicht vorhanden waren, wurden von den Versuchs-Ergebnissen ausgeschlossen.

VERSUCHSERGEBNISSE.

A. Glykolytische Wirkung des Rückstands der Oberschicht.

VERSUCH I.

15 ccm Kaninchenerythrozytenbrei (Hämatkrienzahl 73) + 30 ccm Äther; gemischt, zentrifugiert. Der Rückstand der 10 ccm Oberschicht + 10 ccm Zitratgemisch (isotonisch, pH=7,7) + 1 ccm 56% Glucose.....(a),
Phosphatgemisch (isotonisch, pH=7,7) statt Zitratgemisch(b).

	Versuchsdauer	Milchsäure (mg/dl)	Glucose (mg/dl)
(a)	sofort	—	502
	nach 20 Stunden	—	508
	Differenz	0	+6
(b)	sofort	—	494
	nach 20 Stunden	—	492
	Differenz	0	-2

Wie wir aus diesem Versuch sehen, zeigt der Rückstand der oberen, ganz klaren, durchsichtigen, farblosen Schicht sowohl in dem Zitrat- als auch Phosphat-Gemisch weder merkwürdige Veränderung der Glucose noch Bildung von Milchsäure.

B. Glykolytische Wirkung der Mittelschicht.

VERSUCH II.

Die Mittelschicht aus 20 ccm Erythrozytenbrei (Hämatkrienzahl 73)+20 ccm Zitrat-Gemisch (isotonisch, pH=7,7). Diese Mischung in 2 geteilt. In die eine wird 1 ccm 5,6% Glucose(a),
in die andere nichts zugesetzt(b).

	Versuchsdauer	Milchsäure (mg/dl)	Glucose (mg/dl)
(a)	sofort	—	536
	nach 18 Stunden	—	536
	Differenz	0	0
(b)	sofort	—	6
	nach 18 Stunden	—	6
	Differenz	0	0

VERSUCH III.

Die Mittelschicht aus 15 ccm Erythrozyten+10 ccm Phosphatgemisch (isotonisch, pH=7,7). Diese Mischung in 2 geteilt. In die eine 0,5 ccm 5,6% Glucose(a),
in die andere nichts zugestzt(b).

	Versuchsdauer	Milchsäure (mg/dl)	Glucose (mg/dl)
(a)	sofort	—	484
	nach 20 Stunden	—	460
	Differenz	0	-24
(b)	sofort	—	16
	nach 20 Stunden	—	12
	Differenz	0	-4

Aus den Versuchen ergibt sich, dass die weiche, leicht gelbliche Emulsion im Zitratgemisch weder Glucoseschwund noch Milchsäurebildung herbeiführt, während sie im Phosphatgemisch nur spurenweise hervorzubringen sind.

C. Glykolytische Wirkung der Unterschicht.

VERSUCH IV.

(A) Im Medium des Zitratgemisches.

10 ccm der Unterschicht + 1 ccm 5,6% Glucose(a),

Unterschicht ohne Zusatz von Glucose.....(b).

	Versuchsdauer	Milchsäure (mg/dl)	Glucose (mg/dl)
(a)	sofort	33,9	540
	nach 18 Stunden	37,9	570
	Differenz	+ 4,0	+ 30
(b)	sofort	34,3	6
	nach 18 Stunden	36,7	38
	Differenz	+ 2,4	+ 32

VERSUCH V.

(B) Im Medium des Phosphatgemisches.

5 ccm der Unterschicht + 0,5 ccm 5% Glucose(a),

10 ccm der Unterschicht (Hämatkritenzahl 89) + 1 ccm 5,6%

Glucose(b),

10 ccm der Unterschicht (Hämatkritenzahl 75) + 1 ccm 5,6%

Glucose(c),

Unterschicht ohne Zusatz von Glucose(d),

	Versuchsdauer	Milchsäure (mg/dl)	Glucose (mg/dl)
(a)	sofort	25,0	430
	nach 14 Stunden	81,1	376
	Differenz	+ 56,1	- 54
(b)	sofort	19,6	564
	nach 21 Stunden	226,3	36
	nach 35 Stunden	256,9	38
	Differenz	+ 237,3	- 526
(c)	sofort	16,9	544
	nach 14 Stunden	249,3	51
	nach 38 Stunden	244,9	38
	Differenz	+ 228,0	- 506
(d)	sofort	26,0	4
	nach 20 Stunden	31,2	32
	Differenz	+ 5,2	+ 28

Aus den angeführten Versuchen geht hervor, dass in der sehr dicken, bordeauxroten, vollständig von mikroskopischen Gebilden befreiten, ganz durchsichtigen Unterschicht der Schwund des Traubenzuckers und die Bildung der Milchsäure sehr gering sind falls sie im Zitratgemisch sich befindet, dagegen zeigt sie in dem Phosphatgemisch Glucoseschwund und Milchsäurebildung sehr deutlich.

Nun können wir also sicher sagen, dass nicht nur das hämolysierte Blut, sondern auch die von der Äther-Hämolyse extrahierte Flüssigkeit noch deutliche glykolytische Wirkung ausübt.

ZUSAMMENFASSUNG.

Das mittels des Äthers hämolysierte und daraus abgeschiedene, ganz von dem mikroskopischen Gebilde abgetrennte Erythrozyten-Extrakt verrät noch deutliche glykolytische Wirkung im Medium des Phosphatgemisches; dagegen zeigt es im Medium des Zitratgemisches keine nennenswerte glykolytische Wirkung.

An dieser Stelle spreche ich Herrn Prof. Dr. S. Kozawa und Herrn Dr. K. Fukushima meinen aufrichtigsten Dank für Ihre Anleitung und Ratschläge aus.

LITERATUR.

- Aibara (1922); *Jl. of Biochem.* **1**.
Doyon & Morel (1903); *Comp. rend. Soc. biol.* **55**.
Edelmann (1912); *Bioch. Zeitschr. B.* **40**.
Hagedorn & Jøensen (1923); *Bioch. Zeitschr.* **135**.
Kawashima (1922, 1923); *Jl. of Biochem.* **2**, **3**.
Mendel & Goldscheider (1925); *Bioch. Zeitschr.* **164**.
J. de Meyer (1910); *Central. f. Physiol.* **23**.
Nishian, Hiruma & Fukushima (1921); *Tokio Igakukwai Zasshi*, **35**.
Rona & Arnheim (1913); *Bioch. Zeitschr.* **48**.
Rona & Döblin (1911); *Bioch. Zeitschr.* **32**.

ÜBER DIE PENTOSURIE BEI EXPERIMENTELLEM STAUUNGSIKTERUS UND BEI SUBCUTANER ZUFUHR DER GALLENSÄUREN BEIM KANINCHEN.

VON

TODI KOBAYASHI.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Okayama.
Vorstand: Prof. Dr. T. Shimidzu.)

(Eingegangen am 24. Februar 1928.)

Im hiesigem Institut hat Karasawa (1926) beobachtet, dass die Organautolyse durch Zusatz von Gallensäuren im allgemeinen herabgesetzt wird und die Nucleinspaltung dadurch etwas gesteigert wird. Weiter hat er (1927) den Einfluss der Gallensäuren auf den physiologischen Eiweissstoffwechsel bzw. Purinstoffwechsel untersucht und nachgewiesen, dass der Nucleinstoffwechsel des Kaninchens durch Zufuhr der Gallensäuren gesteigert und so die Purinausscheidung im Harn dadurch ziemlich vermehrt wird.

Bald danach hat Hatakeyama (1927) an Kaninchen experimentell bewiesen, dass bei Stauungsikterus der Nucleinstoffwechsel durch Rückresorption der Gallensäuren in den allgemeinen Kreislauf ziemlich stark befördert wird und sich das Allantoin im Harn mit der Phosphorsäure pararell vermehrt.

Im Jahre 1922 haben Brugsch und Rother die Harnsäure in der Galle gefunden und die Ansicht ausgesprochen, dass, eine grosse Menge der Harnsäure mit der Galle in den Darm ausgeschieden wird, die als enterotropische Harnsäure bezeichnet und von der im Harn ausgeschiedenen urotropischen Harnsäure unterschieden wird. Dabei erklärten sie, dass die vermehrte Ausscheidung der Harnsäure im Harn bei Stauungsikterus dadurch zustande käme, dass die enterotropische Harnsäure in der Galle durch die Absperrung des Gallenwegs in den allgemeinen Kreislauf gelangt und in den Harn ausgeschieden wird.

Dagegen haben Karasawa und Hatakeyama durch genaue Experimente bewiesen, dass die vermehrte Ausscheidung der Harnsäure bei Stauungsikterus der durch die zurückresorbierten Gallensäure bedingten Steigerung des Nucleinstoffwechsel zuzuschreiben ist. Schon Harpuder (1923) behauptete, dass die Menge der mit der Galle ausgeschiedenen Harnsäure im Verhältnis zu der des Harns sehr gering sei, so dass sie für den Purinstoffwechsel von keiner merklichen Bedeutung sein könne. Danach haben sich Krüger und Schittenhelm (1902) dieser Ansicht angeschlossen.

Bekanntlich werden die Purine und Harnsäuren im Harn in solche endogenen und exogenen Ursprungs eingeteilt. Die endogene Purinausscheidung ist individuell konstant. Der Fütterungsversuch von Mc. Collum (1909) beweist, dass die Nucleinsynthese im Organismus ohne Einnahme von Nucleinsäuren oder Purinkörpern als Nahrung stattfinden kann und die Regeneration der sich zersetzenden Nucleinstoffe dadurch aus den anderen Proteinstoffen stattfinden.

Dieser intermediäre Purinstoffwechsel ist auf die Wirksamkeit der Fermenttätigkeit zurückzuführen.

Im Verdauungskanal geht die Aufspaltung der Nucleinsäure nur bis zu den Nucleotiden bzw. Nucleosiden, die unzersetzt durch die Darmwand aufgenommen werden. Voraussichtlich ist also die Leber das erste Organ, dessen Zellen Gelegenheit zu einem tieferen Eingriff in ihr Gefüge gegeben ist.

Da die Nucleosidasen in allen Geweben verbreitet sind, beschränkt sich die erste Spaltung, die neben Kohlenhydrat Purin- und Pyrimidinbasen liefert, nicht auf die Leber allein. Thannhauser und Bommers (1914) haben gezeigt, dass Anzeichen dafür bestehen, dass die Oxydation der Abspaltung des Zuckers vorangeht. Seit Karasawa in seinem Versuche behauptet hat, dass der Nucleinstoffwechsel durch die Gallensäuren befördert wird, hat Okamura (1928) gefunden, dass die Gallensäuren die Nucleasenwirkung in Leber und Darmschleimhaut steigern, und er behauptet, dass der Nucleinstoffwechsel in der Leber

durch die Gallensäuren reguliert wird.

Es ist jetzt eine strittige Frage, ob das Kohlenhydrat der tierischen Nucleinsäuren eine Pentose oder Hexose ist. Es ist jedoch schon allgemein anerkannt, dass das Kohlenhydrat in einer Reihe von Nucleinsäuren, wie Guanylsäure, Adenylsäure und Inosinsäure, nach dem Befund von Levene und Jacobs (1908, 1909, 1910, 1911) d-Ribose ist.

Nach diesen Tatsachen kann man wohl vermuten, dass eine Komponente, das Kohlenhydrat des Nucleinsäuremoleküls, in irgendeiner Form im Harn ausgeschieden werden muss, wenn die Nucleasentätigkeit in den Organen durch die überschüssigen Gallensäuren im Blut gesteigert wird.

Obwohl wir bisher keinen zuverlässigen Beweis für die Zirkulation von Gallensäuren im Organismus haben, besteht doch kein Zweifel darüber, dass im Stauungsikterusblut mehr oder weniger Gallensäure enthalten ist und dass diese irgendeinen Einfluss auf die Kohlenhydratspaltung des Nucleinsäuremoleküls ausübt.

Daraufhin habe ich bei der subcutanen Zufuhr der Gallensäuren und bei experimentellem Stauungsikterus des Kaninchens das Kohlenhydrat im Harn untersucht und merkwürdigerweise gefunden, dass bei beiden Fällen eine Pentosurie auftritt, und zwar inaktive Arabinose im Harn ausgeschieden wird.

Im hiesigen Laboratorium hat Misaki (1927) nachgewiesen, dass die Gallensäure den Haushalt des Kohlenhydrates im Organismus reguliert, indem sie gegen das Adrenalin antagonistisch wirkt. Dabei hat er beobachtet, dass der nüchterne Blutzucker und die Hyperglykämie, die beim Kaninchen durch die intravenöse Zufuhr des Traubenzuckers herbeigeführt wird, durch die Zufuhr der Gallensäuren herabgesetzt werden.

Andererseits wird die inaktive Arabinose bei Stauungsikterus und bei Zufuhr der Gallensäuren im Harn ausgeschieden. Nach diesen Tatsachen muss der Zuckergehalt im Blut und im Harn bei Stauungsikterus oder bei Zufuhr der Gallensäuren, der nach der Reduktionsmethode bestimmt wird, etwas höher sein als der,

der wirklich in den Versuchen, wie Z. B. von Misaki (1927) gefunden wurde, in denen die Bestimmung des Blutzuckergehalts bei Zufuhr der Gallensäuren nach der Bangschen Methode stattfand.

Bei Stauungsikterus haben schon Yoshida (1926) und Okamura (1927) experimentell gefunden, dass der Blutzuckergehalt keinen so merklich niedrigen Wert aufweist, wie Okamura nach seinem Versuch meinte.

Bei Ableitung der Galle nach aussen im gallenblasenfisteltragenden Kaninchen hat Okamura den höheren Wert des Blutzuckers beobachtet.

Er hat dabei erklärt, dass der durch die Ableitung der Galle nach aussen hervorgerufene Gallensäureverlust aus dem Organismus die gesteigerte Glykogenmobilisation herbeiführt, indem das gegen Gallensäuren antagonistisch wirkende Adrenalin im Organismus durch den Gallensäureverlust vermehrt wird.

Schon einmal hat E. Fischer auf Grund seines synthetischen Experiments von Zuckerreihen die Vermutung ausgesprochen, dass das primäre Product der Assimilation von inaktiver razemischer Form sei, deren eine Komponente durch biologische Prozesse als Zucker der Vernichtung anheimfällt, während die andere intakt bleibt. So konnte man erklären, dass der in der Natur vorkommende optisch aktive Zucker, der bei der Nucleinspaltung zu beobachten ist, durch die Beeinflussung der Gallensäuren in die inaktive Form umgewandelt und bei Stauungsikterus oder bei Zufuhr der Gallensäuren als solcher ausgeschieden wird.

Wie schon erwähnt wurde, werden der Nucleinstoffwechsel bzw. die Purin- und Phosphorsäureausscheidung im Harn und die Nucleinspaltung in der Leber und in der Darmschleimhaut durch die Gallensäuren gesteigert.

So scheint mir die inaktive Arabinose, die bei Stauungsikterus oder bei Zufuhr der Gallensäuren im Harn des Kaninchens ausgeschieden wird, aus der Zuckerkomponente von Nucleoproteiden in den Zellen verschiedener Organe zu stammen.

Im Jahre 1900 hat Neuberg am Schluss seines zusammenfassenden Vortrags über die Harnpentosen die Ansicht ausgesprochen, dass die Frage, ob die aus den Nucleoproteiden der verschiedenen tierischen Organe abspaltbaren Pentosen in Beziehung zu der aus Harn isolierten r-Arabinose stehen, theoretisch von grossem Interesse sei, und die Charakterisierung der betreffenden Zucker nach der Neubergschen Methode versucht werden solle. Nach Fischer und Neuberg steht die Ausscheidung der Pentosen im Harn in inniger Beziehung zu dem Nucleinstoffwechsel. Zum ersten Male wurde die Harnpentose durch Neuberg (1900, 1913) und Aron (1913) hauptsächlich durch Darstellung ihres schwerlöslichen Diphenylhydrazons als dl-Arabinose erkannt. Doch wurde schon vorher die Pentosurie von Salkowski und Jastrowitz (1892) beobachtet, indem diese Forscher die Pentose im Harn durch die Phloroglucin- u. Orcinreaktion nach Tollens und die Furfurolreaktion nachwiesen. Aber in der überwiegenden Mehrzahl der Fälle wurde nach Zerner u. Wältuch (1914), Hiller (1913), Levene u. La Forge (1913, 1914) im Harn Xyloketose gefunden.

Da die Harnpentose in unreiner Lösung sehr empfindlich ist, habe ich sie nach der Methode von Neuberg (1900) als Diphenylhydrazon dargestellt und durch ihre physikalischen, chemischen Eigenschaften und Analyse identifiziert. Zur weiteren näheren Charakterisierung wurde ausser Osazon p-Bromphenylosazon dargestellt und beide durch ihre Eigenschaften und ihren Analysenwert als r-Arabinose bestimmt. Diese Pentosenausscheidung im Harn kommt nicht nur bei Stauungsikterus, sondern auch bei Injektion der Gallensäuren zustande.

Diese Tatsache zusammen mit den Befunden von Karasawa und Hatakeyama beweisen, dass die Pentosurie bei Stauungsikterus der Wirkung der Gallensäuren zuzuschreiben ist und die Pentose im Harn aus den Nucleinen des Organismus stammen dürfte.

Experimenteller Teil.**PENTOSENHARN.**

Zwecks Sammlung des Pentosenharns injizierte ich dem Kaninchen täglich subcutan 3 ccm der einprozentigen Natriumcholatlösung und sammelte den täglichen Harn unter Toluol. Einige Tage vor dem Versuch und während des Versuches fütterte ich das Kaninchen täglich mit 200 g Okara. Während des Versuches frass das Tier gut und blieb völlig gesund.

Zur Sammlung des ikterischen Harns laparatomierte ich das Kaninchen, band nach der üblichen Methode den Ductus choledochus fest und beendete die Operation. Die Nahrung bestand pro Tag aus 50 g Okara, 50 g Gemüse und 100 ccm Wasser. Der ikterische Harn wurde täglich unter Toluol gesammelt.

Beide Harne sind bei Zimmertemperatur gelblich getrübt, werden aber beim Stehenlassen bei Zimmertemperatur dunkelbraun. Beide frischen Harne sind wie der gewöhnliche Harn alkalisch, und zeigen die Phloroglucin- und Orcinsalzsäurereaktion nach Tollens.

FURFUOLREAKTION.

Je 200 ccm von beiden Harnen wurden in einem Kolben mit der gleichen Menge konzentrierter Salzsäure so weit abdestilliert, bis das Destillat etwa 300 ccm betrug. Um daraus Furfurol zu isolieren, neutralisierte ich mit Soda, setzte etwa 80 g Kochsalz zu und destillierte ungefähr 100 ccm davon ab. Dieses Destillat wurde wieder mit Kochsalz gesättigt und mit Äther extrahiert. Beim Verdampfen des Äthers bleibt das Furfurol als gefärbtes Öl zurück. Beim Versetzen des Öls mit Anilinacetatlösung entsteht eine schöne rote Färbung, mit einer wässerigen Lösung von salzsaurem Phenylhydrazin kristallisiert es in einem dicken Brei.

DIPHENYLHYDRAZON.

650 ccm von den durch Zufuhr der Gallensäuren erhaltenen Kaninchenharnen wurden im Vacuum bei einer 36° nicht überschreitenden Temperatur auf etwa 30 ccm eingengt, dann in 300 ccm heissen 98 %-igen Alkohols eingegossen und etwa 30° warm von den ausgeschiedenen Salzen abfiltriert. Das Filtrat enthielt nur einen Teil der Pentosen, eine beträchtliche Menge derselben befand sich noch in den Harnsalzen. Diese Salze wurden an der Luft getrocknet, von anhaftenden harzigen Bestandteilen durch Äther und Petroläther befreit und dann in feingepulvertem Zustande mit 200 ccm 93 %-igen Alkohols in dem Kolben 24 Stunden extrahiert. Dabei wurde eine beträchtliche Menge der Pentosen in den Salzen zerstört.

Der alkoholische Auszug und das Filtrat der ersten Fällung wurden dann wieder im Vacuum bei etwa 36° auf ca. 30 ccm eingengt und mit 300 ccm 98 %-igen Alkohols versetzt. Die von den abermals ausgeschiedenen Substanzen noch warm abfiltrierte, dunkelbraune Flüssigkeit wurde mit Tierkohle entfärbt und das Filtrat auf etwa 30 ccm eingengt. Zu der alkoholischen Pentosenlösung wurde 0,3 g Diphenylhydrazin hinzugefügt und auf dem Wasserbade 15 Minuten lang erwärmt und heiss filtriert. Das Filtrat wurde 24 Stunden im Eisschrank stehen gelassen. Da schieden sich rötlichgelb gefärbte, drüsenartig kristallisierte Massen aus. Die Masse wurde abgesaugt und mit Wasser gut gewaschen. Das im Vacuum über Schwefelsäure getrocknete Rohprodukt, dessen Gewicht 0,2 g betrug, wurde aus dem 50 %-igen wässerigen Pyridin unter Zusatz von Tierkohle umkristallisiert und mehrmals aus demselben gereinigt. Es lieferte etwa 0,15 g einer aus sternförmig gruppierten Nadeln bestehenden weissen Kristallmasse.

Dieselbe wurde im Vacuum über Schwefelsäure und bei 110° getrocknet und erwies sich bei der Analyse als das Diphenylhydrazon der Harnpentosen.

Dasselbe ist in kaltem Wasser und Alkohol unlöslich und

auch in der Hitze nur schwer löslich. Es wird etwas in siedendem Chloroform, Aceton, Toluol und Benzol aufgenommen. In Äther und Petroläther ist es unlöslich, in Pyridin und Eisessig dagegen leicht löslich. Das Diphenylhydrazon schmilzt bei 205°–206°. Seine Pyridinlösung ist optisch inaktiv.

Analyse: 0,05 g Substanz verbrauchten 3,2 ccm N/10 H₂SO₄.

Für	C ₁₇ H ₂₀ O ₄ N ₂	Ber.	N	8,87 %
		Gef.	„	8,96 „

Den Eigenschaften und der Analyse nach stimmt das erhaltene Diphenylhydrazon mit dem von Neuberg aus Pentosenharn gewonnenen r-Arabinosediphenylhydrazon gut überein.

PHENYLOSAZON.

Die für die Darstellung des Diphenylhydrazons bezogene alkoholische Pentosenlösung aus den durch Gallensäurezufuhr erhaltenen Harnen von Kaninchen wurde im Vacuum bei 36° zur Trockne eingedampft und wieder in 30 ccm Wasser gelöst, darauf 20 Tropfen Eisessig und dieselbe Menge von Phenylhydrazin hinzugefügt und eine Stunde lang im siedenden Wasserbade erhitzt. Das Reaktionsgemisch wurde wieder unter Zusatz von Tierkohle erwärmt und heiss filtriert. Aus dem Filtrate schied sich beim Einengen über Schwefelsäure eine schwachgelb gefärbte, aus Blättchen bestehende Kristallmasse aus. Dieses aus wässrigem Pyridin umkristallisierte und im Vacuum bei 110° getrocknete Osazon schmilzt bei 168°–170°.

Die optische Untersuchung des Osazons nach der Pyridin-Alkohol-Methode nach Neuberg (1900) zeigt seine völlige Inaktivität. Das entstandene Osazon ist identisch mit dem von Neuberg aus Pentosenharn gewonnenen r-Arabinoseosazon.

P-BROMPHENYLOSAZON.

Ungefähr 50 ccm Harn, der entweder von stauungsikterischen oder von mit Gallensäure injizierten Kaninchen stammte, wurden mit 30 Tropfen Eisessig und 0,5 g p-Bromphenylhydrazin versetzt und eine Stunde in siedendem Wasserbade

erwärmt und heiss filtriert. Nach dem Erkalten war das Filtrat von einem dicken Brei feiner Nadelchen erfüllt, die nuss-schalenartig zusammengruppiert waren. Der Kristallniederschlag wurde abgesaugt und aus der verdünnten wässerigen Pyridinlösung unter Zusatz von Tierkohle umkristallisiert. Das so gereinigte und im Vacuum bei 110° getrocknete p-Bromphenylosazon schmilzt bei 202° – 203° .

Es ist in Alkohol und Pyridin leicht löslich, nicht aber in Wasser, Äther, Petroläther, Chloroform, Benzol und Toluol, und auch in heissem Wasser nur schwer löslich. Diese oben erwähnten Eigenschaften und die Analyse stimmen mit denen des von Neuberg aus Pentosenaharn direkt gewonnenen p-Bromphenylosazons der r-Arabinose gut überein.

Das Osazon zeigt im Pyridin-Alkoholgemisch keine Drehung. Analyse: 1) Osazon aus dem ikterischen Harn.

0,1 g Substanz	verbrauchten	8,3 ccm N/10 H_2SO_4	
Für $C_{17}H_{18}O_3N_4Br_2$	Ber.	N	11,52 %
	Gef.	„	11,62 %

2) Osazon aus dem durch Gallensäurezufuhr erhaltenen Harn.

0,1136 g Substanz	verbrauchten	9,5 ccm N/10 H_2SO_4	
Für $C_{17}H_{18}O_3N_4Br_2$	Ber.	N	11,52 %
	Gef.	„	11,70 %

LITERATUR.

- Aron H. (1913): Z. f. Kinderheilk. 1913. 177.
 Brugsch T. u. Rother J. (1922): Klin. Woch. 1. Jg. 30. 1495.
 „ „ (1922): „ 1922. S. 1495 u. 1729.
 Fischer E. (1890): B. 23 2133.
 Harpuder K. (1923): Klin Woch. 2. Jg. 10. 436.
 Hatakeyama T. (1927): The Journ. of Bioch. 8, 261.
 Hiller (1917): Journ. of biol. Chem. 30. 129.
 Karasawa R. (1926): The Journ. of Bioch. 6. 139.
 „ (1927): „ 7. 145.
 Krüger W. u. Schittenhelm A. (1902): H. 35. 153.
 Levene u. Jacobs (1908): B. 42. 748.
 „ (1909): „ „ 335, 2474, 2703.

- Levene u. Jacobs (1910): B. **43**. 3150. 3162.
 " (1911): „ **44**. 746.
Levene u. La Forge (1913): Journ. of biol. Chem. **15**. 481.
 " (1914): „ **18**. 319.
Mc. Collum (1909): Amer. Journ. of Physiolog. **25**. 120.
Neuberg C. (1900): B. **33**. 2243.
 " l. c. und (1913): Bioch. Z. **56**. 506.
Okamura, Takezi. (1928): The Journ. of Bioch. **8**. 391.
Okamura, Teiji (1928). Journ. of Bioch. **9**. 271
Salkowski E. u. Jastrowitz (1892): Central. f. d. med. W.
 1892. Nr. 19. 337.
 " „ 35. 593.
Thannhauser u. Bommers (1914): H. **91**. 336.
Yoschida M. (1926): Nissinigaku 17. Jg. Nr. 3. 396.
Zerner u. Waltuch (1914): Bioch, Z. **58**. 410.

BEDEUTUNG DER GALLENSÄURE IM KOHLEN- HYDRATSTOFFWECHSEL IV.

Antagonistische Wirkung der Gallensäure gegen Adrenalin (1)

VON

KANAE MURAKAMI.

*(Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Okayama
Vorstand: Prof. Dr. T. Shimizu.)*

(Eingegangen am 25. Februar 1928.)

Neben der nervösen Regulierung des Glykogenabbaus haben neue Arbeiten auch die chemischen Einflüsse klargestellt, die das Insulin des Pankreas und das Adrenalin der Nebenniere auf die Zuckerbildung in der Leber ausüben. Injektion von Adrenalin veranlasst eine rasche Mobilisierung des Leberglykogens und Glykosurie. Die Nebennieren geben fortwährend kleine Adrenalinmengen in das Blut ab, die nach Erfüllung ihrer physiologischen Aufgaben der Zerstörung anheimfallen. Der Zuckerstich führt nach Kahn (1911, 1912) eine Verarmung der Nebenniere an Adrenalin herbei. Man hat daraus und aus der Wirkungslosigkeit des Zuckerstichs beim nebennierenlosen Tier den Schluss gezogen, dass der Zuckerstich nicht unmittelbar auf die Leber, sondern durch Vermittlung der Nebenniere bzw. des Adrenalins wirkt. Danach nimmt man allgemein an, dass es durch die Exstirpation der Nebenniere zu Hypoglykämie kommt.

Nun hat im Jahre 1927 Misaki im hiesigen Institut gefunden, dass die experimentelle, durch Injektion von Adrenalin erzeugte Hyperglykämie durch die Zufuhr von Gallensäuren herabgesetzt wird, und weiter, dass die Zufuhr von Gallensäuren die Adrenalinsekretion der Nebenniere hemmt.

Daraus hat er den Schluss gezogen, dass die Gallensäure zu dem Haushalt der Kohlenhydrate in inniger Beziehung steht, und dass sie im Kohlenhydratstoffwechsel im Organismus bzw.

in der Leber mit dem Insulin des Pankreas als regulierender Faktor gegen das Adrenalin eine grosse Rolle spielt.

In diesem Sinne muss die Gallensäure mit dem Adrenalin im Kreislauf in bestimmter Menge vorhanden sein. In der Tat ist die Gallensäure im enterohepatischen Kreislauf immer in minimaler Menge vorhanden, wie das Schiff (1870) und Stadelmann (1896) in ihren Experimenten bewiesen haben.

Seit Tappeiner (1878) und Croftan (1902) betont haben, dass die Gallensäure im allgemeinen Kreislauf vorhanden sein muss, haben sich neuerdings auch Szilard (1926), Rosenthal (1927) und Hosokawa (1926, 1927) dieser Anschauung angeschlossen. Es ist natürlich denkbar, dass die Gallensäure bei Stauungsikterus den Organen und Geweben zugeführt und sogar aus den Nieren im Harn ausgeschieden wird. In diesem Fall müsste die Adrenalinsekretion der Nebenniere durch die in das Blut zugeführte Gallensäure vermindert werden.

Im Gegenteil müsste die Adrenalinsekretion der Nebenniere vermehrt sein, wenn Gallensäureverlust aus dem Organismus, wie z. B. bei Ableitung der Galle nach aussen durch die Gallenblasenfistel stattfände, oder wenn die Gallensäure in der Galle durch Leberkrankheiten oder Cholelithiasis fehlte, wie dies Sugano (1927) als erster tatsächlich beobachtet hat.

Danach würde die Gallensäuremenge in der Galle durch die Exstirpation der Nebenniere vermehrt sein, weil das antagonistisch wirkende Adrenalin im Blut dadurch vermindert wird. Und weiter müsste der Zuckergehalt des Blutes von Tieren mit exstirpierter Nebenniere durch die Gallensäurevermehrung im Blut viel stärker herabgesetzt sein als der normaler Tiere.

In diesem Sinn habe ich das Thema aufgenommen, um mir einerseits über den Einfluss der Gallensäure auf den Blutzuckergehalt des teilweise nebennierenlosen Kaninchens und andererseits über den einseitigen Nebennierenexstirpation bei Kaninchen auf den Gallensäuregehalt in der Galle und weiter über die antagonistische Wirkung der Gallensäure gegen das Adrenalin Klarheit zu verschaffen.

Experimenteller Teil.**A. EINFLUSS DER GALLENSÄUREZUFUHR AUF DEN
BLUTZUCKER DES KANINCHENS MIT EINSEITIG
EXSTIRPIERTER NEBENNIERE.***Methodik.*

Die Untersuchung des Blutzuckers erfolgte erst nach 2–7 Tagen, nachdem die linke Nebenniere des Kaninchens nach der üblichen Methode exstirpiert worden war und das Tier sich gut erholt hatte. Nach Feststellung des Ausgangswertes des Nüchternblutzuckers wurden dem Kaninchen 4–5 ccm einer 1 %igen Lösung von Cholsaurem Natrium oder 3.4–4 ccm einer 3 %igen Lösung von dehydrocholsaurem Natrium subkutan injiziert. In kurzen Zeitintervallen wurde der Verlauf des Blutzuckers verfolgt. Als Kontrolle injizierte ich 5 ccm 0.85 % iger physiologischer Kochsalzlösung. Bei den Versuchen, wo der Einfluss der Gallensäure auf die experimentelle Hyperglykämie geprüft wurde, erfolgte sofort die subkutane Zufuhr von Gallensäuren, nachdem 90–120 ccm 20%iger Traubenzuckerlösung per os verabreicht worden waren. Hierbei erhielt als Kontrolle das Kaninchen nur die Traubenzuckerlösung per os. Die Blutzuckerbestimmungen wurden nach dem neuen Verfahren von Bang ausgeführt.

*I. Einfluss der Gallensäurezufuhr auf den Nüchtern-
blutzucker des Kaninchens mit einseitig
exstirpierter Nebenniere.*

Es wurde bei den einseitig nebennierenlosen Kaninchen, die ca. 12 Stunden gehungert hatten, der Einfluss der subkutanen Zufuhr von 5 ccm einer 1 %igen Natriumcholatlösung und von 3.4–3.6 ccm einer 3 %igen Dehydrocholatlösung auf den Nüchternblutzucker geprüft. Dabei zeigte sich bei den Versuchen mit Cholsäure nur ein schwacher Abfall des Blutzuckers, bei denen mit Dehydrocholsäure dagegen ein deutlicher. Die Versuche sind in Tabelle I zusammengestellt.

TABELLE I.

Nr.	Körper- gewicht in g	Blutzucker in %								Bemerkungen
		Vor der Injek- tion	nach Stunden nach der Injektion							
			1	2	3	4	5	6	24	
1	2630	0.057	0.053	0.047	0.046	0.050	0.051	0.053	0.056	1% Natriumeholatlö- sung 5ccm subkutan
2	2500	0.060	0.059	0.051	0.049	0.057	0.059	0.058	0.060	„
3	2540	0.062	0.067	0.070	0.067	0.069	0.072	0.066	0.063	0.85% NaCl-Lösung 5ccm subkutan
4	1790	0.069	0.067	0.056	0.044	0.060	0.064	0.068	0.070	3% Dehy- drocholatlösung 3.6ccm subkutan
5	1780	0.065	0.056	0.047	0.050	0.052	0.055	0.065	0.060	„ 3.4ccm subkutan

Aus der Tabelle geht hervor, dass der Abfall des Blutzuckers in der dritten Stunde nach der Injektion stattfindet, wie das schon Misaki in seinem Versuch am normalen Kaninchen beobachtet hat. Bei den Versuchen mit Cholsäure fällt der Blutzucker um 19 % des Ausgangswertes und bei denen mit Dehydrocholsäure um 28–36 %. Die Cholsäure und die Dehydrocholsäure bewirken bei dem einseitig nebennierenlosen Kaninchen nicht so merklich den Blutzucker herabsetzend wie bei normalen.

*II. Einfluss der Gallensäurezufuhr auf die experimentelle
Hyperglykämie des Kaninchens mit einseitig
exstirpierter Nebenniere.*

Hierbei wurde der Einfluss der Gallensäurezufuhr auf die experimentelle, durch die perorale Zufuhr von Traubenzucker erzeugte Hyperglykämie untersucht. Nach Zufuhr einer 20 % igen Glukoselösung steigt der Blutzucker maximal in der 3.–4. Stunde an, um dann wieder zu fallen. Bei den gleichen Kaninchen wurden sofort 4–5 ccm einer 1 %igen Natriumcholatlösung oder einmal 3.4 ccm einer 1 %igen und 2 mal 4–7 ccm einer 3 %

igen Natriumdehydrocholatlösung subkutan eingespritzt, nachdem 90–120 ccm einer 20 %igen Traubenzuckerlösung per os verabreicht worden waren. Die Versuche sind in Tabelle II zusammengestellt.

Bei den Versuchen mit Cholsäure ist in einem Falle eine

TABELLE II.

Nr.	Körper- gewicht in g	Blutzucker in % nach Stunden								Bemerkungen
		Vor	nach der Fütterung von Glukose oder mit Injektion der Gallensäure							
			1	2	3	4	5	6	24	
1	2370	0.058	0.075	0.085	0.101	0.112	0.087	0.076	0.055	20 %ige Glukose- lösung 120 ccm
2	2360	0.060	0.071	0.085	0.097	0.102	0.078	0.069	0.057	20 %ige Glukose- lösung 120 ccm per os und 1 %ige Cholatlösung 5 ccm subkutan
3	1700	0.067	0.110	0.261	0.264	0.292	0.245	0.182	0.072	20 %ige Glukose- lösung 90 ccm
4	1690	0.061	0.079	0.161	0.179	0.207	0.158	0.134	0.064	„ und 1 %ige Cholatlösung 4 ccm
5	1903	0.069	0.181	0.221	0.368	0.241	0.198	0.098	0.072	20 %ige Glukose- lösung 95 ccm
6	1920	0.063	0.171	0.256	0.295	0.214	0.175	0.135	0.062	„ und 3 %ige Dehydrocholatlösung 4 ccm
7	1820	0.066	0.172	0.182	0.225	0.188	0.179	0.124	0.061	20 %ige Glukose- lösung 90 ccm
8	1790	0.051	0.163	0.193	0.234	0.172	0.116	0.104	0.066	„ und 1 %ige Dehydrocholatlösung 3.4 ccm
9	2000	0.064	0.099	0.192	0.264	0.212	0.124	0.104	0.070	20 %ige Glukose- lösung 100 ccm
10	1990	0.060	0.108	0.186	0.234	0.189	0.103	0.093	0.067	„ und 3 %ige Dehydrocholatlösung 4 ccm
11	1700	0.058	0.191	0.235	0.272	0.135	0.127	0.103	0.072	20 %ige Glukose- lösung 85 ccm
12	1723	0.068	0.177	0.207	0.193	0.183	0.112	0.099	0.076	„ und 3 %ige Dehydrocholatlösung 7 ccm

schwache Verlangsamung, in einem anderen Fall eine deutliche im Ansteigen des Blutzuckers zu beobachten, wonach das Ansteigen des Blutzuckers bei den Versuchen mit Gallensäuren in Vergleich mit der Kontrolle geringer ist.

Bei den Versuchen mit einer 1%igen Dehydrocholatlösung findet sich eine ganz schwache Verlangsamung, aber bei den Versuchen mit einer 3%igen Dehydrocholatlösung eine deutliche Verlangsamung im Ansteigen des Blutzuckers, wonach der Blutzucker bei den letzteren Fällen im Vergleich mit der Kontrolle viel geringer steigt. Schon Adlersberg und Roth (1927) zeigten, dass die Dehydrocholsäure den Abfall einer experimentellen Hyperglykämie verzögert. Auf Grund dieser Tatsache erklärten sie, dass die Verlangsamung im Ansteigen des Blutzuckers durch die verzögerte glykogenolytische Funktion der Leber bedingt sei.

Bei meinem Versuche setzt die Zufuhr von Gallensäuren (Cholsäure, Dehydrocholsäure) nicht nur den Nüchternblutzucker des Kaninchens mit einseitig exstirpierter Nebenniere, sondern auch den Zucker der experimentellhyperglykämischen Kaninchen bei dem Versuch mit Dehydrocholsäure deutlich herab.

Das Experiment mit Cholsäure stimmt gut mit den Versuchen von Misaki überein. Der Adrenalinegehalt im Blut muss durch die einseitige Exstirpation der Nebenniere vermindert sein, weil der Blutzucker dadurch eine deutliche Herabsetzung erfährt, indem die Glykogenmobilisation in der Leber durch die Verminderung des Adrenalins im Blut verzögert wird. Doch sind der Nüchternblutzucker und die experimentelle Hyperglykämie des Kaninchens mit einseitiger exstirpierter Nebenniere durch die Zufuhr der Gallensäure nicht viel mehr herabgesetzt als die des normalen Kaninchens.

Diese Tatsache findet seine Erklärung darin, dass die Gallensäure im Blut durch die einseitige Nebennierenexstirpation vermehrt wird, wie der nächste Versuch zeigt, weil die nicht-entfernte Nebenniere das antagonistisch wirkende Adrenalin in geringerem Masse als die vorher beiderseitig vorhandenen Nebennieren sezerniert.

B. EINFLUSS DER NEBENNIERNEXSTIRPATION AUF DIE AUSSCHIEDUNG DER GALLENSÄURE IN DER GALLE.

Nachdem die linke Nebenniere des Kaninchens exstirpiert worden und das Tier sich völlig erholt hatte, untersuchte ich seinen Blutzucker, um zu sehen, ob wirklich durch die einseitige Exstirpation der Nebenniere Hypoglykämie stattfindet. Sowie ich mich von dem verminderten Blutzuckergehalt überzeugt hatte, legte ich bei dem Kaninchen nach Dastre eine permanente Gallenblasenfistel an und unterband den Ductus choledochus stets doppelt an zwei Stellen. Sowie sich das Kaninchen erholt hatte, wurde es zum Versuch verwendet. Während des Versuches befestigte ich auf dem Rücken des Kaninchens mittelst Gummischlauches einen Erlenmyerkolben, der mit der Gallenblasenfistel in Verbindung stand und sammelte in diesem (von 8 Uhr morgens bis 2 Uhr nachmittags) die Galle. Es steht fest, dass zwischen Gallenabsonderung und Nahrungsaufnahme eine bestimmte Beziehung besteht, und dass ferner die Art der Nahrung von Einfluss ist. Bei meinem Versuche diente als Futter 50 g trockenes Okara, 50 g frisches Gemüse und 120 ccm Wasser. Das alles wurde auf einmal 3 Uhr nachmittags verabreicht. Die andere Galle ausser der in 6 Stunden gesammelten, liess ich das Tier als solche oder mit dem Gemüse zusammen ablecken.

Die Gallensäuremenge in der Galle wurde durch die gasometrische Methode von Foster und Hooper (1919) bestimmt. Zur Kontrolle untersuchte ich die Galle von normalen Kaninchen. Die Versuchsergebnisse sind in Tabelle III zusammengestellt.

Aus den Versuchen 1-3 und dem Kontrollversuch kann man ersehen, dass die Gallensäure in der Galle beim Kaninchen mit exstirpierter Nebenniere der absoluten Menge nach und procentual bedeutend vermehrt ist, als die des normalen Kaninchens. Es wurde schon von Yonemura bewiesen, dass die aus der Fistel abfliessende Galle des Hundes und die Gallensäure derselben sich mit der Zeit vermindert, wenn das Tier seine

TABELLE III.

Versuch 1. (1 Woche nach der Nebennierenerstirpation)
Kaninchen 1950 g.
(Blutzucker: 0.067 %)

Datum 1927	Ausgeschied. Gallenmenge In cem	Spez. Gewicht.	Aminostick- stoff, mg.		Taurochol- säure mg.	
			In 1 cc Galle	in 6 Stun- den	in 6 Stun- den	%
11/XI	37	1012	0.089	3.293	120.91	0.326
12/ "	32	"	"	2.848	104.57	0.326
13/ "	30	1015	0.082	2.460	90.33	0.301
14/ "	10	1014	0.073	0.730	26.80	0.263

Versuch 2. (2 Wochen)
Kaninchen 2065 g.
(Blutzucker: 0.062 %)

Datum 1927	Ausgeschied. Gallenmenge In cem	Spez. Gewicht.	Aminostick- stoff, mg.		Taurochol- säure mg.	
			in 1 cc Galle	in 6 Stun- den	in 6 Stun- den	%
16/XI	57	1015	0.079	4.503	161.35	0.283
17/ "	40	1014	0.082	3.280	120.44	0.301
18/ "	17	1016	0.074	1.253	46.19	0.271

Versuch 3. (4 Tage)
Kaninchen 2700 g
(Blutzucker: 0.054 %)

Datum 1927	Ausgeschied. Gallenmenge In cem	Spez. Gewicht.	Aminostick- stoff, mg.		Taurochol- säure mg.	
			In 1 cc Galle	in 6 Stun- den	in 6 Stun- den	%
20/XI	36	1013	0.089	3.204	117.65	0.326
21/ "	37	"	0.081	2.997	110.04	0.297
22/ "	16	1014	0.087	1.392	51.11	0.319
23/ "	12	1015	0.080	0.960	36.25	0.302

Kontrollversuch.
Kaninchen 1920 g.
(Blutzucker: 0.104)

Datum 1927	Ausgeschied. Gallenmenge In cem	Spez. Gewicht.	Aminostick- stoff, mg.		Taurochol- säure mg.	
			in 1 cc Galle	in 6 Stun- den	in 6 Stun- den	%
6/XI	32	1013	0.054	1.728	63.45	0.197
7/ "	31	1012	0.058	1.798	66.02	0.212
8/ "	12	1013	0.055	0.660	24.23	0.205
9/ "	"	1012	0.059	0.708	25.99	0.208

eigene Galle nicht ableckt, auch wenn es täglich die gleiche bestimmte Nahrung aufnimmt. Bei meinem Versuche habe ich 6 Stunden alte Galle zur Bestimmung der Gallensäure gebraucht.

Dabei verminderten sich ganz wie bei Yonemura mit der Zeit der absolute Gallensäurewert und die Gallenmenge. Aber der Procentgehalt der Gallensäure ist im allgemeinen nicht vermindert, weder bei den normalen noch bei den Tieren mit exstirpierter Nebenniere. Schon Sakurai (1926) hat bewiesen, dass das unter Erhöhung des Blutzuckers wirkende Adrenalin die Gallenausscheidung hemmt. Aus meinen Versuchen geht hervor, dass die vermehrte Gallenausscheidung des einseitig nebennierenlosen Kaninchens im Vergleich mit dem normalen dadurch bedingt wird, dass der Adrenalinegehalt im Blut durch die Exstirpation der Nebenniere vermindert ist und es so durch den Wegfall des Adrenalins im Blut zu einer Vermehrung der Gallensäure kommt. Der hypoglykämische Zustand des einseitig nebennierenlosen Kaninchens ist zum Teil auf die vermehrte Gallensäure im Blut zurückzuführen.

ZUSAMMENFASSUNG.

1. Die Zufuhr von Gallensäuren (Cholsäure, Dehydrocholsäure) setzt nicht nur den Nüchternblutzucker des Kaninchens mit exstirpierter Nebenniere, sondern auch den bei experimenteller, durch Verabreichung von Glukose erzeugter Hyperglykämie herab, wie das auch bei normalen Kaninchen der Fall ist.

2. Die einseitige Nebennierenexstirpation des Kaninchens führt zu vermehrter Gallensäure- und Gallenausscheidung. Dabei vermehrt sich die Gallensäure der absoluten Menge und dem Prozentsatze nach.

3. Es scheint mir, dass die durch Exstirpation der Nebenniere vermehrte Gallensäureausscheidung dem Mindergehalt des Blutes an Adrenalin zuzuschreiben ist und der hypoglykämische Zustand, der durch die Exstirpation der Nebenniere zustande kommt, durch die antagonistische Wirkung der im Blut vermehrten Gallensäure bedingt ist.

LITERATUREN,

- Adlersberg, D. u. Róth, E. (1927): Arch. f. experim. Path. u. Pharm. **121**. 131.
- Croftan, a. c. (1902): Pflügers Archiv. **90**. 359.
- Foster u. Hooper (1919): Journ of Biol. Chem. **38**. 359.
- Hosokawa, R. (1926): Okayama Igakukaizasshi Nr. 441. 1061.
- Hosokawa, R. (1927): Okayama Igakukaizasshi Nr. 448. 593.
- Kahn (1911): Pflügers Archiv **140**. 209.
- Kahn (1912): Pflügers Archiv **144**. 251 u. 396.
- Kahn (1912): Pflügers Archiv **146**. 578.
- Misaki K. (1927): Journ. of Bioch. **8**. 235.
- Rosenthal (1927): Archiv f. experim. Path. u. Pharm. **122**. 158.
- Schiff. (1890): Pflügers Archiv **3**.
- Stadelmann (1896): Z. f. Biolog. **34**. 27.
- Sugano, D. (1927): Journ. of Bioch. **7**. 457.
- Szillard, T. (1926): Bioch. Zeitschr. **173**. 340.
- Sakurai, E. (1926): Mitt d. Gesell. zu Tokio **40**. 328.
- Tappeiner, H. (1878): Sitzungsberichte d. kais. Akad. zu Wien **77**. 281.
- Yonemura, S. (1926): Journ of Biochem. **7**. 101.

BEDEUTUNG DER GALLENSÄURE IM KOHLENHYDRATSTOFFWECHSEL. V.

Über den Einfluss des Gallensäureverlustes und der überschüssigen Zufuhr der Gallensäure auf den Zuckergehalt des Blutes.

VON

TEIJI OKAMURA.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Okayama.

Vorstand: Prof. Dr. T. Shimizu.)

(Eingegangen am 9. März 1928.)

Es ist allgemein bekannt, dass das Adrenalin in der Nebenniere die Aufgabe hat, die Leber zum Abbau ihrer Glykogenbestände zu veranlassen. Seit Blum (1901, 1902) kann man nicht mehr daran zweifeln, dass das Adrenalin Hyperglykämie, Glykosurie und eine Verarmung der Leber an Glykogen bewirkt, wenn es in die Blutbahn injiziert wird. Aus diesem Grunde ist das Adrenalin mit dem Insulin des Pankreas im Kohlenhydratstoffwechsel als chemischer Regulator unentbehrlich. Bis heute war die Bedeutung der Gallensäure in der Galle im Kohlenhydratstoffwechsel von niemand berücksichtigt worden. Neuerdings ist zuerst von Misaki (1927) beobachtet worden, dass die Gallensäure hypoglykämische Wirkung hat, und gegen das Adrenalin antagonistisch wirkt. Misaki hat noch weiter beobachtet, dass die Gallensäure die Nebennierensekretion an Adrenalin hemmt. Diese Tatsachen wurden danach durch die Versuche von K. Murakami (1928) und A. Taku (1928) bestätigt.

Aus diesen Daten hat Misaki geschlossen, dass die Gallensäure im Kohlenhydratstoffwechsel des Organismus dem Adrenalin gegenüber eine grosse Rolle spielt. Murakami hat schon nach seinem Experiment bemerkt, dass die durch die einseitige

Exstirpation der Nebenniere bedingte Gallensäurevermehrung in der Galle dem Mindergehalt des antagonistisch wirkenden Adrenalins im Blut zuzuschreiben ist, und weiter, dass der hypoglykämische Zustand des einseitig nebennierenlosen Kaninchens durch die Vermehrung der antagonistisch wirkenden Gallensäure bedingt ist.

In diesem Sinne muss die Gallensäuremenge im Organismus entsprechend, je nach der Menge des Adrenalins im Blut, vermehrt oder vermindert sein. Aus diesem Grunde kann man wohl annehmen, dass die überschüssige Zufuhr von Gallensäure, wie z. B. bei Stauungsikterus, einen verminderten Adrenalin-gehalt des Blutes herbeiführen würde, und der Gallensäureverlust aus dem Organismus, wie z. B. bei Ableitung der Galle nach aussen durch die Gallenblasenfistel, im Gegenteil einen vermehrten Wert des Adrenalin-gehaltes im Blut zeigen würde.

Als Folge davon muss der Zuckergehalt des Blutes bei Gallensäureverlust aus dem Organismus gesteigert werden und bei überschüssigem Zufluss der Gallensäure ins Blut dagegen herabgesetzt werden.

Aus diesem Grunde habe ich den Blutzuckergehalt des Kaninchens bei Stauungsikterus und bei Ableitung der Galle nach aussen durch die Gallenblasenfistel untersucht. Schon S. Yoshida (1927) hat beobachtet, dass der Zuckergehalt des Blutes bei experimentellem Stauungsikterus des Kaninchens herabgesetzt wird. Dabei hat er diese Blutzuckersenkung ausschliesslich der nekrotischen Veränderung der Lebergewebe zugeschrieben. Bei Stauungsikterus muss man auch die Diffusion der Gallensäure in Organen und Geweben berücksichtigen, die eine hypoglykämische Wirkung hat. In der Tat wird der Blutzuckergehalt bei experimentellem Stauungsikterus des Kaninchens im allgemeinen herabgesetzt, dagegen bei experimentellem Gallensäureverlust gesteigert. Um zu sehen, ob diese Steigerung des Blutzuckers bei Gallensäureverlust wirklich der verlorenen Gallensäure des Organismus zuzuschreiben wäre, habe ich den Blutzuckergehalt des Gallenblasenfistel tragenden Ka-

ninchens untersucht, nachdem ich die verlorene Gallensäure wieder durch subcutane oder perorale Zufuhr ersetzt hatte.

Experimenteller Teil.

I. EINFLUSS DES GALLENSÄUREVERLUSTES AUF DEN BLUTZUCKER DES KANINCHENS.

Methodik.

Um einen Gallensäureverlust des Körpers herbeizuführen, habe ich dem Kaninchen die Gallenblasenfistel in der Weise angelegt, dass ich den Ductus choledochus in der Nähe des Darmes immer an zwei Stellen doppelt unterbunden, anstatt der Kanüle Dastre eine kleine Glaskanüle von 0,3 cm Durchmesser in die Blase eingenäht und einen Erlenmeyerkolben, der mittelst eines Gummischlauches mit der Glaskanüle der Gallenblase in Verbindung steht, auf dem Rücken des Kaninchens festgelegt habe. In diesem Kolben wurde die aus der Fistel zufließende Galle gesammelt und während des Versuches dem Kaninchen unmöglich gemacht, die Galle aus der Fistel abzulecken. Während des Versuches habe ich jeden Tag eine der Gallenmenge aus der Fistel fast gleiche Wassermenge durch die Sonde in den Magen eingeführt, damit die Konzentration des Blutes nicht verändert werden konnte. Durch die Ableitung der Galle nach aussen verliert das Kaninchen seinen Appetit und frisst nur wenig Gemüse. Ferner habe ich als Kontrolltier unter gleichen Bedingungen ein anderes Kaninchen behandelt und den Blutzuckergehalt des Versuchstieres und des Kontrolltieres in der gleichen Weise bestimmt. Nach Feststellung der Ausgangswerte des Blutzuckers erfolgte die Untersuchung des Blutzuckers bei Ableitung der Galle nach aussen. Beim Versuch wurde der Blutzuckergehalt jeden Tag in kurzen Zeitintervallen nach dem neuen Verfahren von Bang immer doppelt bestimmt und der Durchschnittswert angegeben. Die Resultate sind in folgenden Tabellen I und II zusammengestellt.

Ergebnisse 1.

Es steht fest, dass der Blutzucker bei Nahrungsaufnahme etwas gesteigert und bei Hunger mit der Zeit allmählich herabgesetzt wird.

Aus den Versuchen 1-4 von Tabelle I und den Kontrollversuchen 1-2 von Tabelle II kann man gut sehen, dass der Blutzuckergehalt bei Ableitung der Galle aus der Gallenblasenfistel mit der Zeit allmählich gesteigert wird. Diese Vermehrung des Blutzuckers des Kaninchens mit dem Gallenverlust beträgt im 3ten Versuch 50% des normalen Werts, und im 1. 2. 4. Versuche sogar 82-83%. Es ist schon erwähnt, dass die Gallensäure eine hypoglykämische Wirkung hat. Die Versuchstiere haben nur wenig Nahrung täglich aufgenommen, und doch zeigt ihr Blutzuckergehalt einen stark vermehrten Wert. Daher scheint es mir, dass diese Blutzuckervermehrung dem Gallensäureverlust durch die Ableitung der Galle nach aussen zuzuschreiben ist.

Durch den Wegfall der Gallensäure im Körper scheint mir das gegen die Gallensäure antagonistisch wirksame Adrenalin im Blut vermehrt zu sein, so dass das Glykogen in Zucker mobilisieren kann.

II. EINFLUSS DER GALLENSÄUREZUFUHR AUF DEN
BLUTZUCKERGEHALT DES KANINCHENS MIT DER
DURCH DEN GALLENVERLUST HERVORGE-
RUFENEN HYPERGLYKÄMIE.

Methodik.

Nachdem ich mich von der Hyperglykämie des Kaninchens, welches aus der Gallenblasenfistel seine Galle verliert, durch die Blutzuckerbestimmung überzeugt hatte, habe ich diesem Kaninchen 0,1-0,13 g subcutan und 0,05-0,5 g Natriumchoolat in einer 1% igen Lösung per os gegeben. Hierauf habe ich den Blutzucker in kurzen Intervallen nach dem neuen Verfahren

von Bang bestimmt, um zu sehen, ob der gesteigerte Blutzuckergehalt durch die Gallensäurezufuhr wieder herabgesetzt werden kann. Darauf habe ich diesen Blutzuckerwert mit dem Anfangswert verglichen. Die Resultate sind in folgenden Tabellen III und IV zusammengestellt.

Ergebnisse 2.

Nach dem Befunde des vorigen Versuches ist klar, dass die Ableitung der Galle nach aussen bei Kaninchen eine allmähliche Steigerung des Blutzuckers herbeiführt. Darüber dass durch die Ableitung der Galle die Gallensäure aus dem Körper verloren geht, besteht kein Zweifel. Aus diesem Grunde kann man wohl annehmen, dass die verlorene Gallensäure durch die Zufuhr wieder ersetzt werden kann. Die durch Gallensäureverlust verursachte Hyperglykämie kann nämlich durch die Ersetzung der Gallensäure, wenigstens für kurze Zeit, wieder herabgesetzt werden. Aus den Tabellen III und IV kann man ersehen, dass die durch Gallenverlust herbeigeführte allmähliche Steigerung des Blutzuckers durch die Zufuhr von Gallensäure im allgemeinen einige Zeit lang gehemmt oder vielmehr herabgesetzt wird. Diese Hemmung ist je nach der Menge der verabreichten Gallensäure ganz verschieden.

Bei subcutaner Zufuhr (Tabelle III) setzt die grössere Menge von 0,13 g viel stärker den Blutzucker herab als die Menge von 0,1 oder 0,12 g. Bei peroraler Zufuhr (Tabelle IV) dauert die allmähliche Steigerung des Blutzuckers ebenso lange wie zuvor bei der Menge von 0,05–0,1 g.. Der Blutzuckergehalt bleibt aber bei Zufuhr von 0,2–0,5 g entweder auf seinem Ausgangswert stehen oder wird vielmehr herabgesetzt.

Misaki hat schon beobachtet, dass die durch subcutane Zufuhr von Gallensäure bedingte Hypoglykämie erst in 3–4 Stunden nach der Injektion hervortritt, und dass die perorale Gallensäurewirkung erst in 3–5 Stunden eintritt, ist von Murakami beobachtet worden. In Übereinstimmung mit dieser Tatsache tritt die hemmende Wirkung der Gallensäure der

Hyperglykämie gegenüber, die durch den Gallensäureverlust verursacht wird, in denselben Zeiten hervor. Aus diesem Ergebnis kann man schliessen, dass die Hyperglykämie, die durch Ableitung der Galle nach aussen herbeigeführt wird, auf den Gallensäureverlust im Körper zurückzuführen ist.

III. EINFLUSS DER ÜBERSCHÜSSIGEN GALLENÄUREZUFUHR (STAUUNGSIKTERUS) AUF DEN BLUTZUCKER.

Methodik.

Zum Zweck des Stauungsikterus habe ich den Ductus choledochus immer an zwei Stellen doppelt unterbunden. In der Mehrzahl der Fälle tritt zuerst eine gelbe Färbung der Haut in 1-2 Tagen nach der Operation auf. Der Gallenfarbstoff ist von dem ersten Tage nach der Operation bis zum Tode durch Gumelin'sche Probe nachweisbar. In einigen Fällen hat das Tier am ersten Tage nach der Operation Hämoglobinurie gehabt, aber schon am 2. Tage ist diese Blutfarbstoffausscheidung verschwunden. Während 1-2 Tage nach der Operation frisst das Tier nicht gern, aber es erholt sich bald zu normalem Appetit. Während des Versuches habe ich immer täglich eine bestimmte Nahrung verabreicht; diese Nahrung bestand aus 50 g getrockneter Okara und 50 g Gemüse. Nach der Feststellung des Ausgangswertes des Blutzuckers habe ich jeden Tag nach der Operation in kurzen Zeitintervallen den Blutzucker nach dem neuen Verfahren von Bang doppelt bestimmt und den Durchschnittswert der gefundenen Zuckerwerte angegeben.

Ergebnisse 3.

Schon im Jahre 1927 wurde von Yoshida festgestellt, dass in anderer Bedeutung der Blutzuckergehalt des stauungsikterischen Kaninchens im allgemeinen niedriger ist als der des normalen.

Mein Ergebnis stimmt mit seinem gut überein. Aus den Versuchen 1-5 von Tabelle V sieht man, dass der Blutzuckergehalt im allgemeinen herabgesetzt ist, oder auf demselben Wert bleibt wie zuvor. In den Fällen von Nr. 4 und 5 zeigt der

Zuckergehalt des Blutes einen deutlich verminderten Wert. In anderen Fällen sieht man im allgemeinen die Neigung zur Blutzuckersenkung. Schon Misaki hat bemerkt, dass die Gallensäure eine hypoglykämische Wirkung hat und gegen das Adrenalin antagonistisch wirkt. Es ist allgemein bekannt, dass die Gallensäure bei Stauungsikterus ins Blut überschüssig eintritt und sogar im Harn ausgeschieden wird. Daher ist es wohl denkbar, dass die Organe und Gewebe durch die Gallensäure diffundiert werden.

Aus diesem Grunde scheint mir die Hypoglykämie bei Stauungsikterus durch die Gallensäurediffusion in Organen und Geweben bedingt zu sein.

Die Gallensäure hemmt die Nebennierensekretion an Adrenalin, wie Misaki in seinem Versuch beobachtet hat. Auch diese Hypoglykämie bei Stauungsikterus scheint mir durch die verminderte Adrenalinsekretion der Nebenniere bedingt zu sein. Die Arbeit darüber ist noch im Gange.

ZUSAMMENFASSUNG.

1. Die experimentelle Ableitung der Galle nach aussen aus der Gallenblasenfistel verursacht mit der Zeit eine allmählich sich steigernde Hyperglykämie.

2. Diese Hyperglykämie wird durch die Zufuhr von Gallensäure herabgesetzt.

3. Der Blutzuckergehalt bei Stauungsikterus zeigt einen verminderten Wert.

4. Aus dem Daten geht hervor, dass der Gallensäureverlust aus dem Organismus Hyperglykämie und die überschüssige Zufuhr von Gallensäure in den Organismus Hypoglykämie erzeugt.

Zum Schluss spreche ich Herrn Prof. Dr. T. Shimizu meinen herzlichen Dank für die so freundliche Leitung meiner Arbeit aus.

Ebenso danke ich dem Unterrichtsministerium ergebenst für das gewährte Stipendium.

TABELLE I.

[illegible]

Versuch 1: Kaninchen, weiss, 2050 gr ♂.

[illegible]

TABELLE III. Versuch 1. (Subcutane Zufuhr).

Nr.	Anfangskörper- gewicht. gm.	Injizierte Cho- latmenge in gm.	Blutzucker % vor Injektionstag			Vor der Injektion	Blutzucker % nach Stunde										Blutzucker % nach Injektionstag			
			11/1 (op.)	12/1	13/1		1/6	1/3	1/2	3/4	1	2	3	4	5	6	15/1	16/1	17/1	17/1
1	2575	0.1	0.097	0.108	0.120	0.126	0.123	0.126	0.124	0.130	0.126	0.125	0.122	0.131	0.129	0.132	0.134	0.145	†	
2	2435	0.12	0.092	0.107	0.117	—	—	0.124	—	0.113	0.126	0.112	0.126	0.129	0.120	0.123	0.136	†	†	
3	2115	0.13	0.099	0.101	0.109	—	—	0.116	—	0.106	0.116	0.114	0.118	0.114	0.113	0.129	0.146	†	†	

TABELLE IV. Versuch 2. (Perorale Zufuhr).

Nr.	Anfangskörper- gewicht. gm.	Gegebene Cholalamenge in gm.	Blinzucker % vor Injektionstag			Vor der Injektion	Blutzucker % nach Stunde								Blutzucker % nach Injektionstag.			
			4/2 (op.)	5/2	6/2		7/2	1	2	3	4	5	6	8/2	9/2	10/2	11/2	
1	2120	0.05	0.090	0.102	0.111	0.117	0.118	0.106	0.119	0.122	0.119	0.110	0.128	—	—	—		
2	2185	0.1	0.096	0.112	0.114	0.126	0.124	0.134	0.122	0.127	0.118	0.117	0.136	+	—	—		
3	2465	0.2	0.097	0.118	0.117	0.121	0.126	0.120	0.111	0.118	0.116	0.119	0.128	—	—	—		
4	2655	0.3	0.108	0.115	0.114	0.121	0.107	0.122	0.112	0.111	0.103	0.119	0.126	0.139	—	—		
5	2120	0.3	—	—	—	0.139	0.142	0.125	0.124	0.110	0.128	0.128	0.146	—	—	—		
6	2465	0.4	—	—	—	0.124	0.121	0.117	0.114	0.160	0.145	0.131	0.149	+	—	—		
7	2655	0.5	—	—	—	0.145	0.154	0.164	0.158	0.143	0.146	0.141	0.170	0.179	+	—		

TABELLE V.

Versuch 1: Kaninchen, weiss. 2410 gr ♂.								
Datum	Harn		Blutzucker %					Bemerkungen
	Menge ccm.	Gmelin's Probe	9 AM.	12 PM.	3	6	Durch- schnitts- wert	
24/11	—	—	—	—	—	—	0.106	Vor
25	79	positiv	0.091	0.095	0.095	0.093	0.093	Nach der Operation
26	144	"	0.098	0.093	0.098	0.094	0.095	"
27	119	"	0.072	0.092	0.095	—	0.086	"
28	122	"	0.088	0.091	0.094	0.090	0.090	"
29	103	"	0.094	0.095	0.094	0.096	0.095	"
30	111	"	0.077	0.076	0.078	0.072	0.076	"
1/12	112	"	0.099	0.092	0.095	0.091	0.094	"
2	153	"	0.098	0.101	0.100	0.096	0.099	"
3	203	"	0.100	0.106	0.096	0.094	0.099	"
4	211	"	0.109	0.109	0.105	—	0.107	"
5	89	"	0.106	0.110	0.106	0.103	0.106	"
6	126	"	0.102	0.110	0.107	—	0.106	"
7	181	"	0.097	0.099	0.102	—	0.099	"
8	136	"	0.102	0.098	0.096	0.099	0.099	"
9	128	"	0.093	0.091	0.106	0.110	0.100	"
10	128	"	0.096	0.108	0.103	—	0.102	"
11	89	"	0.101	0.097	0.099	0.096	0.098	"
12	112	"	0.098	0.095	0.101	—	0.098	"
13	74	"	0.105	0.102	0.096	—	0.101	"
14	101	"	0.109	0.094	0.068	0.063	0.083	"
15	—	—	—	—	—	—	—	gestorben
Versuch 2: Kaninchen, grauweiss. 2325 gr ♂.								
1/12	—	—	—	—	—	—	0.098	Vor
2	48	positiv	0.083	0.083	0.076	0.077	0.079	Nach der Operation
3	63	"	0.099	0.097	0.100	0.098	0.098	"
4	185	"	0.093	0.100	0.096	—	0.096	"
5	156	"	0.093	0.100	0.095	0.094	0.098	"
6	98	"	0.104	0.082	0.082	—	0.089	"
7	92	"	0.089	0.091	0.086	0.088	0.088	"
8	—	—	0.077	0.086	0.083	—	0.082	"
9	85	"	0.091	0.088	0.083	0.080	0.085	"
10	—	—	0.084	0.081	0.076	—	0.080	"
11	36	"	0.072	0.065	0.068	0.078	0.070	"
12	—	—	0.072	0.066	0.069	0.070	0.069	"
13	—	—	—	—	—	—	—	gestorben
Versuch 3: Kaninchen, weiss. 2380 gr ♂.								
12/12	—	—	—	—	—	—	0.095	Vor
13	88	positiv	0.079	0.083	0.086	0.083	0.083	Nach der Operation
14	74	blutig	0.083	0.077	0.089	0.086	0.084	"
15	158	"	0.093	0.090	0.097	—	0.093	"
16	121	"	0.087	0.085	0.094	—	0.088	"
17	68	"	0.087	0.099	0.090	—	0.092	"
18	86	"	0.083	0.091	0.092	—	0.089	"
19	126	"	0.084	0.095	0.094	—	0.091	"

LITERATUR.

- Blum F. (1901): Deutsch. Arch. f. kl. Med. **71**. 146.
 Blum F. (1902): Pflüg. Arch. **90**. 617.
 Misaki K. (1927): Journ. of Biochem. **8**. 235.
 Murakami K. (1928): Journ. of Biochem. **9**. 261.
 Taku A. (1928): Journ. of Biochem. Erscheint im nächsten Heft.
 Yoshida S. (1927): Nisshinigaku. **17**. 396.

EINFLUSS DES ERGOTAMINS AUF EXPERIMENTELLE HYPERGLYKÄMIEN.

VON

GENICHIRO EDA.

*(Aus der medizinischen Klinik von Prof. Dr. Ryokichi Inada,
Kaiserliche Universität zu Tokyo.)*

(Eingegangen am 14. März 1928.)

Wie bekannt, verursachen verschiedene Momente eine mehr oder minder ausgesprochene Hyperglykämie, was gewöhnlich dadurch zustande kommt, dass die Erregung der Zuckerzentren durch vegetative Nervenfasern nach den Erfolgsorganen fortgeleitet wird. Zur Erläuterung des Mechanismus solcher Hyperglykämie wurde die Durchschneidung der Splanchnici resp. Vagi ausgeführt oder parasympathische Lähmungsgifte z. B. Atropin, verabreicht und deren Einfluss auf die Blutzuckersteigerung untersucht. Nachdem das Ergotoxin resp. Ergotamin als ein sympathisches Lähmungsgift festgestellt wurde, hat man das Mittel auch zum Gebrauch genommen, um festzustellen, ob die vorliegende Hyperglykämie sympathischer Natur ist.

Dass Ergotamin die Adrenalinhyperglykämie deutlich unterdrückt, wurde schon von vielen Seiten (Miculicich, 1912; Masamune, 1926, ii; Sakurai, 1926) festgestellt. Es liegt auch eine Angabe vor, dass das Gift ebenso Diuretinhyperglykämie (Miculicich (1912), Sakurai (1926)) und alimentäre Blutzuckersteigerung (Grunke, 1926; Hetenyi und Pogany, 1926) herabsetzt.

Was den Einfluss des Ergotamins auf die übrigen Arten der Hyperglykämie anbetrifft, so sind nur wenige Mitteilungen in der Literatur vorhanden. Deswegen habe ich mich entschlossen, diese Frage unter der Leitung von Prof. R. Inada und K. Sakaguchi weiter zu studieren.

Um die Wirksamkeit des von mir gebrauchten Mittels festzustellen, habe ich zuerst den Einfluss des Giftes auf die

Diuretinhyperglykämie untersucht und dann weiter andere Arten Hyperglykämie studiert, welche durch Zufuhr von Coffein, Pilocarpin, Antipyretica, Kochsalz oder Pikrotoxin hervorgerufen wurden.

Bei meinen Untersuchungen ging ich so vor, dass ich zuerst dem Kaninchen hyperglykämisierende Substanzen injizierte und darauf halbstündlich drei Stunden lang den Blutzuckergehalt nach Bangscher Methode untersuchte. In den eigentlichen Versuchen wurde 0.5 mg Ergotaminum tartaricum (Gynergen Sandoz) 1/4 Stunde vor Zufuhr der oben genannten Substanzen subkutan injiziert und dann genau wie bei den Kontrollversuchen untersucht.

I. EINFLUSS DES ERGOTAMINS AUF DIE DIURETIN-HYPERGLYKÄMIE.

Die Diuretinhyperglykämie wird durch Splanchnicusdurchschneidung (Pollak, 1909; Nishi, 1909; Fujii, 1920) und durch Ergotoxin (Miculicich, 1912; Sakurai 1926) aufgehoben, was darauf hinweist, dass diese Hyperglykämie ohne Zweifel durch sympathische Erregung hervorgerufen wird.

Wie Tabelle I zeigt, konnte ich auch am Kaninchen bei subkutaner Injektion von 10 - 15 ccm 10 % Diuretinlösung eine deutliche Hyperglykämie beobachten, welche durch subkutane Zufuhr von 0.5 mg Ergotamin deutlich unterdrückt wurde.

II. EINFLUSS DES ERGOTAMINS AUF DIE COFFEIN-HYPERGLYKÄMIE.

Im allgemeinen glaubt man, dass die Coffeinhyperglykämie durch die Reizung des sympathischen Nervensystems zustande kommt. Pollak (1909) und Bardier (1922) konnten nachweisen, dass diese Hyperglykämie nach beiderseitiger Splanchnicotomie ausbleibt. Hieraus kann man schon von vornherein vermuten, dass Ergotamin auch diese Hyperglykämie unterdrückt, was ich in Wirklichkeit bestätigen konnte. Einzelne Daten sind in Tabelle II wiedergegeben.

Ergotamin und experimentelle Hyperglykämie. 287

TABELLE I.

Kanin- chen-Nr. (Körper- gewicht)	Datum 1927	1 % ige Diuretin lösung ccm	Ergota- min mg	Blutzucker mg %					
				vor	1/2	1	11/2	2	3
I (2.7 kg)	16. IX	15		88	86	102	106	108	118
	18. IX	„		83	90	113	122	130	128
	15. IX	„	0.5	105	81	81	87	86	99
	19. IX	„	„	96	84	83	85	89	89
II (2.3 kg)	16. IX	„		103	147	201	206	274	273
	18. IX	„		98	133	167	178	195	201
	15. IX	„	0.3	72	80	86	102	102	90
	19. IX	„	„	85	89	92	92	89	86
III (2.1 kg)	19. IX	10		85	113	128	156	188	215
	21. IX	„		90	123	125	125	166	200
	15. IX	„	0.5	89	86	103	115	117	108
	17. IX	„	„	88	92	97	100	89	89
IV (2.45 kg)	17. IX	„		101	145	149	165	166	206
	20. IX	„		85	133	140	160	188	160
	19. IX	„	0.5	92	97	119	130	123	160
	22. IX	„	„	90	100	98	123	131	158
V (2.55 kg)	19. IX	„		97	168	228	306	354	405
	22. IX	„		95	150	193	248	296	309
	17. IX	„	0.5	104	120	118	138	174	143
	20. IX	„	„	100	113	125	130	158	139

TABELLE II.

Kanin- chen-Nr, (Körper- gewicht)	Datum 1927	Coffein- lösung % ccm	Ergota- min mg	Blutzucker mg %					
				vor	1/2	1	11/2	2	3
I (2.7 kg)	27. X	1 50		87	100	111	114	127	119
	1. XI	1.7 30		95	115	137	178	215	223
	29. X	1 50	0.5	89	81	90	93	97	112
	3. XI	1.7 30	"	87	96	100	99	101	105
II (2.6 kg)	27. X	1 50		92	107	144	157	174	179
	1. XI	1.7 30		90	138	166	212	261	241
	29. X	1 50	0.5	95	100	88	83	83	82
	3. XI	1.7 30	"	93	110	120	126	129	134
III (2.5 kg)	27. X	1 40		80	128	133	134	147	148
	1. XI	1.7 30		90	127	157	143	177	200
	29. X	1 45	0.5	85	108	103	116	124	121
	3. XI	1.7 30	"	93	100	131	146	140	136
IV (2.45 kg)	30. X	1.25 40		90	117	110	116	132	173
	3. XI	1.5 20		92	90	121	147	158	170
	1. XI	1.25 40	0.5	95	105	101	105	123	112
	5. X	1.5 20	"	96	120	123	116	128	116
V (2.5 kg)	8. XI	0.7 30		95	115	110	112	116	119
	11. XI	1 20		83	100	120	113	110	100
	9. XI	0.7 30	0.5	85	60	78	75	74	60
	13. XI	1 20	"	83	78	77	79	82	89

Aus der Tabelle kann man ersehen, dass die Coffeinhyperglykämie in allen Fällen durch Ergotamin deutlich unterdrückt wird. Einmal (Nr. 5) habe ich sogar bei Ergotaminversuchen keinen Blutzuckeranstieg sondern eher eine Hypoglykämie beobachtet.

III. EINFLUSS DES ERGOTAMINS AUF DIE PILOCARPIN-HYPERGLYKÄMIE.

Von vielen Seiten wurde festgestellt, dass Pilocarpin in grossen Dosen eine Hyperglykämie verursacht, welche nach Kinoshita (1926), Masamune (1926, i) und Sakurai (1926) durch Splanchnicusdurchschneidung ausbleibt. Das Gift soll aber in kleinen Dosen eine Blutzuckersenkung (Bornstein und Vogel, 1921; Sakurai, 1926) und nach Sakurai bei kombinierter Injektion von Pilocarpin und Ergotoxin eine stärkere Hypoglykämie verursachen, als bei Versuchen, wo nur das letztere injiziert wurde. Aus diesen Befunden schliesst Sakurai, dass Parasympathicusreizung eigentlich eine Blutzuckersenkung nach sich zieht und die Pilocarpinhyperglykämie durch zentrale Reizung des sympathischen Nervensystems zustande kommt.

Ich konnte auch beim Kaninchen durch Pilocarpininjektion in grossen Dosen eine deutliche Hyperglykämie hervorrufen, welche durch vorangehende Ergotamininjektion deutlich gehemmt wurde (Tabelle III.). An einem Tiere (Nr. 1) beobachtete ich sogar nach der Injektion von beiden Substanzen einmal eine deutliche Hypoglykämie.

IV. EINFLUSS DES ERGOTAMINS AUF DIE DURCH ANTIPYRETICA VERURSACHTEN HYPERGLYKÄMIE.

Wie bekannt verursacht grosse Chinin- oder Antipyrinzufuhr einen Blutzuckeranstieg, welcher nach Tatum und Cutting bei doppelseitiger Splanchnicusdurchschneidung ausbleibt, weswegen man den zentralen Ursprung der Hyperglykämie annimmt. Ein grosse Dosis Pyramidon veranlasst gleichfalls eine Hyperglykämie. Aber Chiari und Rigler fanden nach kleiner Gabe

TABELLE III.

Kaninchen-Nr. (Körpergewicht)	Datum 1927	1 % ige Pilocarpin lösung ccm	Ergota- min mg	Blutzucker mg %					
				vor	1/2	1	11/2	2	3
I (1.8 kg)	23. IX	0.5		93	127	135	121	113	101
	26. IX	„		90	132	141	135	113	104
	21. IX	„	0.5	91	90	100	106	95	76
	24. IX	„	„	82	66	53	70	52	55
II (2.8 kg)	24. IX	1		88	184	202	189	176	176
	28. IX	„		92	149	165	180	128	163
	26. IX	„	0.5	90	99	96	92	94	82
	30. IX	„	„	87	75	87	92	80	80
III (2.7 kg)	24. IX	„		91	126	151	113	96	92
	28. IX	„		88	112	107	125	94	84
	26. IX	„	0.5	89	89	87	93	80	72
	30. IX	„	„	94	81	81	85	80	75
IV (2.8 kg)	28. IX	„		87	118	130	119	110	100
	2. X	„		85	127	146	137	114	114
	30. IX	„	0.5	89	98	86	95	88	90
	4. X	„	„	92	101	106	98	101	97
V (3.1 kg)	28. IX	„		95	146	130	138	144	125
	2. X	„		90	152	158	176	182	199
	30. IX	„	0.5	92	92	99	101	99	98
	4. X	„	„	92	95	91	105	120	119

dieser Mittel bei gesunden Tieren Hypoglykämie, und bei pankreatomierten dagegen eine Hyperglykämie. Hieraus nehmen die Autoren periphere Natur des Pyramidons an.

Im folgenden habe ich untersucht, wie die genannten Arten Hyperglykämie durch Ergotamin beeinflusst wird.

A. Versuch mit Chinin und Ergotamin.

TABELLE IV.

Kaninchen-Nr. (Körpergewicht)	Datum 1927	2% ige Chinin- lösung ccm	Ergota- min mg	Blutzucker mg %					
				vor	1/2	1	11/2	2	3
I (1.6 kg)	11. X	10		85	109	170	206	246	259
	17. X	„		85	84	147	164	176	132
	22. X	„		83	115	195	229	278	283
	13. X	„		89	102	120	141	174	150
	20. X	„	0.5	87	96	98	99	91	104
	26. X	„	„ „	80	95	105	121	151	191
II (2.7 kg)	20. X	12		83	79	129	149	204	178
	25. X	„		87	225	221	238	216	260
	22. X	„	0.5	80	74	82	82	85	102
	27. X	„	„	88	92	97	112	121	119
III (2.5 kg)	11. X	15		80	79	131	143	189	228
	17. X	„		85	94	108	128	147	162
	13. X	„	0.5	84	80	90	110	115	141
	20. X	„	„	87	71	82	88	103	102
V (2.7 kg)	13. X	15		77	77	101	106	124	175
	19. X	20		79	80	104	164	168	179
	17. X	15	0.5	80	64	94	103	112	130
	22. X	20	„	82	60	73	68	68	79

Wie die Tabelle zeigt, hat die subkutane Zufuhr von 10–20 ccm 2 % ige Chininlösung einen starken Blutzuckeranstieg verursacht. Diese Hyperglykämie wurde in allen vier Fällen durch die vorangehende Zufuhr von 0.5 mg Ergotamin deutlich gehemmt und sogar in einem Fall (Nr. IV) dabei eine leichte Blutzuckersenkung beobachtet.

B. Versuch mit Antipyrin und Ergotamin.

TABELLE V.

Kanin- chen-Nr. (Körper- gewicht)	Datum 1927	Antipyrin- lösung		Ergota- min mg	Blutzucker mg %					
		%	ccm		vor	1/2	1	1 1/2	2	3
I (2.2 kg)	21. X	6	25		77	63	77	88	114	130
	26. X	„	„		83	72	153	193	246	288
	24. X	„	„	0.5	80	73	61	53	42	44
	28. X	„	„	„	85	100	95	98	89	82
II (2.3 kg)	22. X	„	„		86	116	169	206	218	210
	28. X	„	„		92	85	151	166	136	101
	26. X	„	„	0.5	87	74	71	125	138	132
	30. X	„	„	„	88	97	100	113	119	127
III (2.9 kg)	15. X	4	15		92	100	111	110	102	90
	26. X	6	25		87	85	116	109	106	130
	18. X	4	15	0.5	86	81	80	80	77	71
	28. X	6	25	„	90	99	86	107	109	104
IV (3.1 kg)	20. X	6	25		75	68	84	106	110	130
	26. X	7	„		80	85	118	129	138	140
	24. X	6	„	0.5	77	71	76	79	78	81
	28. X	7	„	„	90	105	122	138	127	134
V (2.5 kg)	30. X	6	25		100	141	168	214	235	236
	9. XI	6.5	15		94	141	128	117	112	92
	2. XI	6	25	0.5	83	75	107	123	122	115
	5. XI	6.5	15	„	90	113	109	112	112	199

Hier beobachtet man, dass die Zufuhr von 15–25 ccm 4–7 % ige Antipyrinlösung häufig eine deutliche Hyperglykämie nach sich zieht. Obwohl diese Hyperglykämie auch bei demselben Tiere unter gleichen Bedingungen oft eine starke Schwankung zeigte, so kann man doch aus der Tabelle ersehen, dass Ergotamin bei Fällen, wo in Kontrollversuchen eine deutliche Hyperglykämie zustande kam, unverkennbar hemmend

auf den Blutzuckeranstieg einwirkte. Nach kombinierten Versuchen mit Antipyrin und Ergotamin wurde eine Hyperglykämie oft ganz vermisst (Nr. 1 und 2). Hier wurde sogar eine deutliche resp. leichte Hyperglykämie beobachtet.

C. Versuch mit Pyramidon und Ergotamin.

TABELLE VI.

Kaninchen-Nr. (Körpergewicht)	Datum 1927	2 % ige Pyramidon- lösung ccm	Ergotamin mg	Blutzucker mg %					
				vor	1/2	1	11/2	2	3
I (2.5 kg)	8. X	20		85	141	159	208	225	238
	12. X	15		87	99	107	116	135	107
	5. X	20	0.5	89	73	81	90	85	99
	10. X	15	„	84	94	92	96	88	78
II (2.4 kg)	8. X	20		83	94	141	157	162	139
	12. X	15		90	127	164	161	165	112
	5. X	20	0.5	86	67	71	80	89	86
	10. X	15	„	85	87	95	88	81	77
III (3.1 kg)	5. X	30		92	170	171	166	168	154
	10. X	20		95	120	130	137	132	115
	8. X	30	0.5	100	96	108	99	111	97
	12. X	20	„	94	108	109	116	104	90
IV (2.7 kg)	10. X	15		84	125	130	126	110	90
	14. X	20		80	110	130	132	125	111
	8. X	15	0.5	89	79	77	74	73	73
	12. X	20	„	85	87	80	80	72	75

Wie die Tabelle zeigt, wurde die durch subkutane Zufuhr von 15–30 ccm 2 % ige Pyramidonlösung hervorgerufene Hyperglykämie in allen Fällen durch die vorangehende subkutane Injektion von 0.5 mg Ergotamin fast vollständig unterdrückt. In einem Fall (IV) wurde hier auch eine leichte Blutzuckersenkung beobachtet.

V. EINFLUSS DES ERGOTAMINS AUF DIE KOCHSALZHYPERGLYKÄMIE.

Obwohl Lesser's Angabe (1921), dass Durchströmung der isolierten Froschleber mit hypertotonischer Kochsalzlösung vermehrte Zuckerabgabe zur Folge hat, wahrscheinlich macht, dass die direkte Wirkung der Salzlösung auf die Leber eine gewisse Rolle für Entstehung der Salzhyperglykämie spielt, so scheint die reizende Wirkung auf sympathische Zuckerzentren doch hier ein wesentliches Moment darzustellen, weil die Salzhyperglykämie nach Splanchnicusdurchschneidung ausbleibt (Külz, 1920; Wilenko, 1911; Naito, 1920). Bei dieser Sachlage scheint der Versuch mit Ergotamin bei Salzhyperglykämie von Interesse zu sein.

Bei meinen Versuchen, wo durch intravenöse Zufuhr von 10 - 30 ccm 10 % ige Kochsalzlösung eine mehr oder minder ausgeprägte Blutzuckersteigerung zustande kam, konnte ich, wie die Tabelle VII erkennen lässt, an drei Tieren (Nr. 1, 4 und 5) in ausgeprägter Weise eine hemmende Wirkung des Ergotamins auf die Salzhyperglykämie nachweisen. Bei den übrigen zwei Tieren war die Ergotaminwirkung nicht so auffallend, wie bei den anderen; aber auch hier kann man die Neigung nicht ganz verkennen, dass das Gift auf die Hyperglykämie in gewissem Masse hemmend einwirkte.

VI. EINFLUSS DES ERGOTAMINS AUF DIE PIKROTOXINHYPERKÄMIE.

Heutzutage wird im allgemeinen angenommen, dass die Pikrotoxinhyperglykämie durch die zentrale Reizung des sympathischen Nervensystems zustande kommt (Tatum, 1923; Shimizu, 1924; Rosenthal und seine Mitarbeitern, 1925). Rosenthal und seine Mitarbeiter haben auch nachgewiesen, dass diese Hyperglykämie durch Ergotamin gehemmt wird.

Bei meinen Untersuchungen konnte ich auch am Kaninchen durch subkutane Injektion von 1 mg Pikrotoxin pro Kilogramm

TABELLE VII.

Kaninchen-Nr. (Körpergewicht)	Datum 1927	1 % ige Kochsalz- lösung cem	Ergota- min mg	Blutzucker mg %					
				vor	1/2	1	11/2	2	3
I (2.2 kg)	20. XI	20		95	142	167	145	140	120
	24. XI	„		83	115	157	158	160	140
	22. XI	„		90	84	116	120	110	95
	26. XI	„		82	98	103	130	93	89
II (2.7 kg)	18. XI	20		94	106	116	118	113	104
	22. XI	30		95	173	168	156	148	150
	20. XI	20	0.5	92	113	111	102	99	81
	25. XI	30	„	92	110	118	124	131	92
III (2.5 kg)	20. XI	10		92	119	118	134	128	107
	24. XI	15		90	125	138	136	119	109
	18. XI	10	0.5	89	90	87	97	98	101
	22. XI	15	„	94	118	125	124	92	86
IV (2.4 kg)	24. XI	20		90	144	178	162	146	133
	28. XI	25		80	159	183	171	161	150
	26. XI	20	0.5	87	101	120	117	109	115
	30. XI	25	„	83	120	130	117	121	116
V (2.45 kg)	20. XI	20		80	121	123	141	112	118
	24. XI	„		83	121	132	120	107	105
	22. XI	„	0.5	90	91	88	97	92	83
	26. XI	„	„	87	90	98	100	76	80

Körpergewicht eine Blutzuckersteigerung hervorrufen, welche durch vorangehende Zufuhr von 0.5 mg Ergotamin in allen Versuchen stets deutlich unterdrückt wurde, wie die Tabelle VIII erkennen lässt.

TABELLE VIII.

Kaninchen-Nr. (Körpergewicht)	Datum 1927	Pikro- toxindosis mg	Ergota- min mg	Blutzucker mg %					
				vor	1/2	1	1 1/2	2	3
I (2.5 kg)	9. XI	2		85	78	118	152	145	115
	13. XI	„		79	75	124	119	92	89
	11. XI	„	0.5	80	86	97	115	103	96
	15. XI	„	„	87	97	95	91	91	86
II (2.7 kg)	12. XI	2.5		85	105	143	122	128	119
	17. XI	„		81	88	125	126	108	102
	15. XI	„	0.5	80	90	104	103	102	98
	19. XI	„	„	85	107	106	107	105	103
III (2.55 kg)	12. XI	2.5		90	119	202	243	218	140
	17. XI	„		85	113	148	156	170	131
	15. XI	„	0.5	88	103	110	134	149	122
	19. XI	„	„	87	114	109	108	98	111
IV (2.4 kg)	12. XI	3		92	121	161	167	143	83
	17. XI	„		87	100	123	142	113	105
	15. XI	„	0.5	95	93	101	115	60	72
	19. XI	„	„	86	101	107	110	80	77
V (2.6 kg)	10. XI	2		92	98	96	116	115	119
	14. XI	„		86	102	116	121	98	105
	12. XI	„	0.5	85	87	86	92	96	99
	16. XI	„	„	88	91	92	93	89	82

KURZE ZUSAMMENFASSUNG.

Bei meinen Untersuchungen an Kaninchen konnte ich durch Vorbehandlung (subkutane Zufuhr) mit 0.5 mg Ergotamin Diuretin-, Coffein-, Pilocarpin-, Chinin-, Antipyrin-, Pyramidon-, Pikrotoxin- und Salzhypertglykämie mehr oder minder deutlich unterdrücken. Sogar habe ich oft dabei eine Hypertglykämie

beobachtet. Dieser Befund deutet darauf hin, dass die oben genannten Hyperglykämien wesentlich durch sympathische Erregung zustande kommen. Mein Befund stimmt also mit der Ansicht von Kinoshita, Sakurai und Masamune überein, dass Pilocarpinhyperglykämie sympathischer Natur ist.

LITERATUR.

- Bardier, E., Duchein, P., et Stillmunkès, A. (1922): Kongr. f. d. ges. inn. Med., **23**, 169.
- Bornstein, A. und Vogel, R. (1921): Biochem. Zeits., **118**, 1, **122**, 274.
- Chiari und Rigler: citiert nach Bertram, F. (1926): Kl. Wochens., **46**, 2172.
- Fujii, I. (1920): Tohoku Journ. of exp. Med., **1**, 38.
- Grunke, W. (1926): Zeits. f. d. ges. exp. Med., **52**, 488.
- Hetényi, S. und Pogány, J. (1926): Verhandl. d. Kong. f. inn. Med., **38**, 306.
- Kinoshita. (1926): Fukuoka Ikwadaigaku Zashi., **19**, 254.
- Külz, E. (1911): citiert nach Pollak, L. (1923): Ergeb. d. inn. Med. u. Kinderh., **23**, 387.
- Lesser, E. J. (1921): Biochem. Zeits., **119**, 108.
- Masamune, H. (1926): Fukuoka Ikwadaigaku Zashi., **19**, 137, 254.
- Miculicich, M. (1912): Arch. f. exp. Path. u. Pharm., **69**, 133.
- Naito, K. (1920): Tohoku Journ. of exp. med., **1**, 131.
- Nishi, N. (1909): Arch. f. exp. Path. u. Pharm., **61**, 376.
- Pollak, L. (1909): „ „ „ „ „ „ „ „ 186.
- Rosenthal, F., Licht, H. und Lauterbach, Fr. (1925): Arch. f. exp. Path. u. Pharm., **106**, 233.
- Sakurai, T. (1926): Journ. of Biochem., **VI**, **4**, 487.
- Shimizu, K. (1924): Arch. f. exp. Path. u. Pharm., **103**, 52.
- Tatum, A. L. (1922): Journ. of. pharmacol. a. exp. Therap., **20**, 385.
- Tatum und Cutting: citiert nach Bertram, F. (1926): Kl. Wochens., **46**, 2172.
- Wilenko, G. G. (1911); Arch. f. exp. Path. u. Pharm., **66**, 143.

ÜBER DEN EINFLUSS DER INNERSEKRETORISCHEN SUBSTANZEN, DER PARASYMPATHICUSGIFTE, DER ALKALOIDE UND DER VERSCHIEDENEN SALZE AUF DIE HYPOGLYKÄMISCHE WIRKUNG DER GALLENSÄURE.

VON

AJIRO TAKU.

(Aus dem Physiologisch-chemischen Institut zu Okayama.
Vorstand: Prof. Dr. T. Shimidzu.)

(Eingegangen am 25. März 1928.)

Es ist bereits durch die Versuche von Misaki (1927) bekannt, dass die Gallensäurezufuhr (Cholsäure und Desoxycholsäure) nicht nur den Nüchternblutzucker normaler Kaninchen, sondern auch die experimentelle durch Injektion von Traubenzucker oder Adrenalin erzeugte Hyperglykämie herabsetzt. Misaki hat aus der hemmenden Wirkung der Gallensäure auf die Adrenalinsekretion der Nebenniere geschlossen, dass die Gallensäure gegen das Adrenalin antagonistisch wirkt und die Zufuhr von Gallensäure im allgemeinen eine Vermehrung des Glykogens in der Leber und im Muskel hervorruft. Danach glaubte er behaupten zu dürfen, dass die Gallensäure im Kohlehydratstoffwechsel des Organismus als regulierender Factor eine grosse Rolle spielt.

Die schnelle Anpassung der Leber an den augenblicklichen Zuckerbedarf der Organe hat schon Claude Bernard auf den Gedanken gebracht, dass zwischen dem zuckerverbrauchenden und dem glykogenspaltenden System eine Korrelation bestehen müsse. Neben der nervösen Regulierung des Glykogenabbaus haben neuere Arbeiten auch chemische Einflüsse auf die Zuckerbildung in der Leber klargestellt, die durch das Insulin des Pankreas, das Adrenalin der Nebenniere und die Gallensäure der Leber ausgeübt werden. Nachdem Banting und Best das Insulin des

Pankreas isoliert hatten, wurde die Wirkung dieser Substanz von verschiedenen Autoren nach allerlei Richtungen hin untersucht.

Es ist schon allgemein bekannt, dass das Insulin im Kohlenhydratstoffwechsel gegen das Adrenalin antagonistisch wirkt. So bewirkt nach Nosaka (1925) das Insulin bei der Nebenniere eine Verarmung an Adrenalin, wenn es in kleiner Menge subcutan injiziert wird. Experimente haben gezeigt, dass die Wirkung der Gallensäure der des Insulins ganz ähnlich ist. Misaki beobachtete in seinen Versuchen jedoch, dass die Gallensäure nicht auf die experimentelle, durch Pankreasexstirpation erzeugte Hyperglykämie des Hundes wirkt, wie das beim Insulin der Fall ist. Danach dürfte es sich lohnen, den Einfluss des Insulins auf die hypoglykämische Wirkung der Gallensäure zu untersuchen, um zu sehen, welche Rolle Insulin und Gallensäure im Kohlenhydratstoffwechsel spielen.

Beim Kohlenhydratstoffwechsel ist neben anderen endokrinen Organen auch die Hypophyse von Bedeutung. Daher wurde von vielen Autoren, wie Borchardt (1908), Franchini (1910), Cushing (1910), Stenström (1914), H. Narabayashi (1920), Wakabayashi (1926) und Komuro (1927), der Einfluss des Pituitrins auf den Blutzuckergehalt geprüft. Doch fanden die meisten von ihnen, dass der Hypophysenextract, das Pituitrin, den Blutzuckergehalt vorübergehend herabsetzt. So ist es vielleicht nicht uninteressant zu sehen, wie das Pituitrin sich gegen die Gallensäurewirkung verhält.

Man weiss bereits, dass dem Adrenalin aus der Nebenniere die Aufgabe zufällt, die Leber zum Abbau ihrer Glykogenbestände zu veranlassen. In der Tat bewirkt Adrenalin, wenn es in die Blutbahn injiziert wird, Hyperglykämie, Glykosurie (Blum 1901–1902) und eine Verarmung der Leber an Glykogen. Die antagonistische Wirkung des Adrenalins gegen Gallensäure auf den Blutzuckergehalt des Kaninchens wurde von Misaki nachgewiesen.

Ferner ist bekannt, dass das vegetative Nervensystem bzw. sympathische in inniger Beziehung zu der Glykogenmobilisation

im Organismus steht. Danach ist es von Interesse zu erfahren, welchen Einfluss die Parasympathicusgifte Atropin und Pilocarpin auf die hypoglykämische Wirkung der Gallensäure ausüben. Das Atropin wirkt im Gebiet des parasympathischen Systems lähmend und das Pilocarpin erregend. Betreffs der Wirkung des Atropins und Pilocarpins auf den Blutzuckergehalt finden sich von vielen Autoren, wie Rudisch (1909), Macleod (1908), Mc.Guigan (1916), Bornstein und Vogel (1921), Pitini (1908), Raphael (1899), Maebo (1921), Saito (1921), Kinoshita (1926) und Komuro (1927), Angaben vor, die jedoch voneinander abweichen.

Darin stimmen sie jedoch überein, dass die Zufuhr einer kleinen Menge von Atropin auf den Blutzuckergehalt keinen Einfluss ausübt, aber die einer grosser Hyperglykämie herbeiführt.

Was die Zufuhr von Pilocarpin anbetrifft, so meinen viele Autoren, dass das Pilocarpin im allgemeinen auf den Blutzuckergehalt steigend wirkt.

Es ist eine feststehende Tatsache, dass das Morphin den Blutzuckergehalt steigert. Schon Stewart und Rogoff (1922-1923) haben beobachtet, dass die Zufuhr von Morphin bei Katze und Kaninchen Hyperglykämie herbeiführt. Neuerdings hat Noma (1927) experimentell bestätigt, dass das Morphin nicht nur peroral, sondern auch parenteral hyperglykämisch wirkt. Jene Autoren nehmen an, dass diese hyperglykämische Wirkung in inniger Beziehung zu der Adrenalinsekretion der Nebenniere steht. Die Gallensäure wirkt im Kohlenhydratstoffwechsel gegen das Adrenalin antagonistisch. Danach dürfte es interessant sein, die Beziehung zwischen der Wirkung des Morphins und der der Gallensäure klarzustellen.

Unter den Alkaloiden gibt es viele, die pharmakologisch voneinander ganz verschieden sind.

Das Cocain wird in der Medizin als lokales Anästheticum verwendet, weil es die Endigungen der sensiblen Nerven lähmt und zugleich die peripheren Gefässe kontrahiert. In kleiner Menge reizt es jedoch ganz wie Adrenalin die Endigungen des

Sympathicus. Daher dass Cocain die Wirkung des Adrenalins auf das Sympathicussystem verstärkt, ist es wahrscheinlich, dass die Cocainwirkung in inniger Beziehung zu der Sympathicotonie steht. Dass das Adrenalin das Sympathicussystem stark reizt, Hyperglykämie erzeugt und gegen das Insulin antagonistisch wirkt, ist bereits von Komuro festgestellt worden. Durch den Versuch von Fröhlich und Loewi (1910) ist bewiesen, dass das Cocain die Wirkung des Adrenalins steigert. In Hinsicht auf diese Tatsachen ist es wohl nicht zwecklos, den Einfluss des Cocains auf die hypoglykämische Wirkung der Gallensäure zu prüfen.

Neuerdings hat K. Ito (1924) beobachtet, dass das Coffein beim Organversuch an Frosch und Kaninchen je nach dem Organ mit dem Adrenalin einmal synergetisch und zum anderen antagonistisch wirkt. Im Jahre 1893 hat Jacoby gefunden, dass beim Kaninchen die Zufuhr von Coffein Glykosurie erzeugt. Danach haben Magenta, Biasotti und Senga beobachtet, dass Coffein wie Adrenalin den Blutzuckergehalt steigert. Die Gallensäure wirkt gegen das Adrenalin antagonistisch. Auch hier interessiert es zu erfahren, wie die Gallensäure die Wirkung des Coffeins auf den Blutzucker beeinflusst.

Man weiss schon, dass die verschiedenen Metallsalze in inniger Beziehung zu der Funktion des vegetativen Nervensystems stehen. Kraus und Zondek (1924-1925) usw. stellten Versuche über das Verhältnis zwischen Elektrolyten und dem vegetativen Nervensystem an und nahmen, auf ihre Resultate gestützt, an, dass die doppelgeladenen Calciumionen die sympathische Reizung und die einfachgeladenen Kaliumionen die vagische vermitteln. Nach Kylin und Nyström (1925) ähnelt der Einfluss der Calciumwirkung auf den Blutzucker sehr dem des Adrenalins. Weiter ist bekannt, dass die auf das vegetative Nervensystem wirkenden Substanzen, wie das Adrenalin, auf den Kohlenhydratstoffwechsel einen starken Einfluss ausüben. So erzeugt das Adrenalin durch Sympathicusreizung unter Glykogenmobilisation in der Leber Hyperglykämie. Was die

Parasympathicusreizung anbetrifft, so haben Bornstein, Vogel (1922) und Müller (1922) unter Zufuhr der Parasympathicusgifte Pilocarpin und Cholin den Blutzucker untersucht und gefunden, dass die Parasympathicusreizung unter Glykogenmobilisation der Leber vorübergehende Hyperglykämie erzeugt und diese durch das Atropin völlig beseitigt wird. Dagegen haben Dresel und Zemlin auf Grund ihrer Experimente erklärt, dass die Parasympathicusreizung die Pankreassekretion steigert und der so gesteigerte Zuckerverbrauch in den Geweben zu Hypoglykämie führt. Danach sind also die Autoren über die Wirkung der Parasympathicusreizung im Kohlenhydratstoffwechsel verschiedener Meinung. Soviel darf aber für sicher gelten, dass der Kohlenhydratstoffwechsel zu dem Gleichgewicht des vegetativen Nervensystems und diese Tatsache zur Ionenkonzentration der verschiedenen Metallsalze in inniger Beziehung steht.

E. Barasch (1924) hat durch Zufuhr von Calciumchlorid am Menschen leichte Hyperglykämie beobachtet. Danach haben Zondek und Benatt (1924) am Hunde durch Zufuhr von Calciumchlorid in die Vena portae deutliche Hyperglykämie und bei Zufuhr von Kaliumchlorid Hypoglykämie beobachtet. Diese Wirkung des Kaliumchlorids wurde von Semler an gesunden Menschen und Diabetikern bestätigt. Daraus geht hervor, dass das die Sympathicusreizung vermittelnde Calciumion den Blutzuckergehalt steigert und das die Parasympathicusreizung vermittelnde Kaliunion ihn herabsetzt. Nach alledem dürfte es sich lohnen, den Einfluss des Calciums auf die hypoglykämische Wirkung der Gallensäure zu untersuchen, um einerseits Aufklärung über das Wesen der Gallensäurewirkung und anderseits über die Beziehungen zwischen Calciumionen und Gallensäure im Kohlenhydratstoffwechsel zu erhalten.

Unter den Erdalkalien wirkt am Froschherzen das Magnesium gegen das Calcium antagonistisch, wie es Wiechmann (1920), Macnider und Mathews (1907–1908) und Meltzer (1909) festgestellt haben. Anderseits fand Tominaga (1925), dass das Magnesium die Strophantinwirkung am Froschherzen

prinzipiell mit dem Calcium übereinstimmend beeinflusst. Danach wirkt das Magnesium einerseits gegen das Calcium antagonistisch und anderseits ähnlich wie dieses. In Hinsicht darauf habe ich die Wirkung des Magnesiums auf die hypoglykämische Wirkung der Gallensäure untersucht.

METHODIK.

Als Versuchstier verwendete ich gesunde Kaninchen. Vor dem Versuche wurden sie täglich mit einer bestimmten Menge Okara gefüttert und ruhig im Käfig gehalten.

Beim Versuch musste das Kaninchen 12–13 Stunden hungern und erhielt während der Blutentnahme keine Nahrung.

Die Blutzuckerbestimmungen wurden nach dem neuen Verfahren von Bang (1922) immer doppelt ausgeführt und der Durchschnittswert der beiden Versuche als Blutzuckergehalt angegeben.

Nach Feststellung des Ausgangswerte des Nüchternblutzuckers erfolgte die subcutane Zufuhr von cholsaurem Natrium. Verwendet wurde bei den Kaninchen eine 1% Lösung, von der pro Kg Körpergewicht je 3.0–4.0 ccm appliziert wurden. In kurzen Zeitintervallen und am nächsten Tag wurde dann der Verlauf der Blutzuckerkurve verfolgt. Nachdem der Blutzuckergehalt nach Zufuhr von Gallensäure untersucht worden war, wurde das Kaninchen eine Woche lang sich selbst überlassen. Dann bestimmte ich den Ausgangswert des Nüchternblutzuckers wie zuvor und injizierte gleichzeitig eine bestimmte Menge Natriumcholatlösung subcutan und bestimmte Mengen von den zu untersuchenden Substanzen subcutan oder intravenös. Und endlich verfolgte ich in den oben erwähnten kurzen Zeitintervallen den Verlauf der Blutzuckerkurve.

I. ÜBER DEN EINFLUSS DER INNERSEKRETORISCHEN SUBSTANZEN AUF DIE HYPOGLYKÄMISCHE WIRKUNG DER GALLENSÄURE.

1. *Insulin.*

Bei diesem Versuche injizierte ich zuerst dem Kaninchen

pro Kg Körpergewicht 3.0 ccm einer 1% Natriumcholatlösung subcutan und beobachtete den Verlauf der Blutzuckersenkung. Nach einer Woche wurde dem Kaninchen dieselbe Menge Gallensäurelösung gleichzeitig mit $1/3$ Einheit Insulin pro Kg Körpergewicht subcutan verabreicht und der zeitliche Verlauf des Blutzuckers beobachtet.

Aus der Tabelle I ist ersichtlich, dass die hypoglykämische Wirkung der Gallensäure durch die gleichzeitige Zufuhr von Insulin stets herabgesetzt wird. Die Gallensäure und das Insulin wirken auf den Blutzuckergehalt des Kaninchens synergetisch hypoglykämisch.

Aus diesem Befunde darf man wohl schliessen, dass die Gallensäure, die in der Leber gebildet wird, und das Insulin, das im Pankreas entsteht, im Kohlenhydratstoffwechsel miteinander eine grosse Rolle spielen.

2 Adrenalin.

Diesmal spritzte ich anstatt des Insulins 0.02 ccm einer 0.1% salzsauren Adrenalinlösung nach Sankyo mit der Cholatlösung subcutan ein und verglich den zeitlichen Verlauf der Blutzuckerkurve mit dem des Gallensäureversuches.

Aus der Tabelle II kann man sehen, dass die Hyperglykämie, die durch die Injektion von Adrenalin entsteht, durch die Zufuhr der Gallensäure herabgesetzt wird, und zwar wird die hypoglykämische Wirkung der Gallensäure durch die Zufuhr von Adrenalin gehemmt. Diese Tatsache weist darauf hin, dass die Gallensäure auf den Blutzucker des Kaninchens antagonistisch wirkt.

Durch diese Tatsache ist das Resultat des Versuches von Misaki völlig bestätigt, nachdem die Gallensäure den Nüchternblutzucker des Kaninchens herabsetzt und gegen das Adrenalin antagonistisch wirkt.

3 Pituitrin.

Bei diesem Fall wurde 0.3 ccm des Pituitrins von Park Davis pro Kg Körpergewicht gleichzeitig mit der Cholatlösung dem

TABELLE I. Versuch mit Insulin.

Kaninchen		Chol- säure (g)	Insulin (Eh.)	Vor	Blutzucker % nach Stunden							
Nr.	Körper- gewicht (g) u. Geschlecht				1	2	3	4	5	6	7	8
1.	2230	0.067	— 2 2/3	0.0983	0.0895	0.0819	0.0780	0.0810	0.0809	0.0800	0.0897	0.0957
	♂	— 0.067	2 2/3 2 2/3	0.1022 0.1009	0.0841 0.0655	0.0544 0.0805	0.0778 0.0658	0.0885 0.0843	0.0875 0.0940	0.0985 0.1051	— 0.1113	— 0.1024
2.	2000	0.06	— 2/3	0.0972	0.0886	0.0850	0.0796	0.0767	0.0785	0.0828	— 0.0900	— 0.0893
	♂	— 0.06	2/3 2/3	0.1001 0.0953	0.0870 0.0863	0.0793 0.0726	0.0742 0.0553	0.0795 0.0601	0.0881 0.0694	0.0937 0.0799	— 0.1003	— 0.1055
3.	1750	0.053	— 1.8/3	0.1115	0.0924	0.0842	0.0808	0.0802	0.0826	0.0863	0.0952	— 0.1022
	♂	— 0.053	1.8/3 1.8/3	0.1132 0.1011	0.0900 0.0800	0.0825 0.0734	0.0733 0.0699	0.0794 0.0803	0.0876 0.1025	0.0977 0.1032	— 0.1006	— 0.0998

TABELLE II. Versuch mit Adrenalin.

Kaninchen		Chol- säure (g)	Adren- alin 0.1% (ccm.)	Blutzucker % nach Stunden									
Nr.	Körper- gewicht (g) Geschlecht			Vor	1	2	3	4	5	6	7	8	24
					0.0972 0.0995 0.0929	0.0927 0.1311 0.0989	0.0859 0.1313 0.1000	0.0753 0.1213 0.0978	0.0786 — 0.0943	0.0813 — 0.0947	0.0829 — 0.0961	0.0838 — 0.0962	0.0918 — 0.0960
4.	1930 ♂	0.097 — 0.097	— 0.039 0.039	0.0983 0.0991 0.0996	0.0966 0.1327 0.1038	0.0919 0.1275 0.1002	0.0760 0.1073 0.0967	0.0737 0.1059 0.0952	0.0879 0.1054 0.0953	0.0947 0.1029 0.1015	0.0923 — 0.1015	0.0957 — 0.1013	0.0995 0.0996 0.1019
5.	2170 ♂	0.109 — 0.109	— 0.043 0.043	0.1020 0.0997 0.1026	0.1007 0.1337 0.1073	0.0873 0.1309 0.1041	0.0747 0.1277 0.0984	0.0793 0.1216 0.0956	0.0846 0.1165 0.1013	0.0919 0.1096 0.0979	0.0923 — 0.1022	0.0893 — 0.1019	0.0966 0.1000 0.1015
6.	2410 ♂	0.121 — 0.121	— 0.048 0.048										

Kaninchen subcutan verabreicht und die Blutzuckerkurve mit der bei Gallensäurezufuhr allein verglichen. Vor dem Versuch überzeugte ich mich natürlich, dass die Zufuhr von 0.3 ccm Pituitrin pro Kg Körpergewicht beim Kaninchen Hypoglykämie hervorruft.

Die Tabelle III zeigt, dass das Pituitrin in der Versuchsmenge, die hypoglykämische Wirkung der Gallensäure im allgemeinen nicht beeinflusst oder höchstens etwas hemmt. Bei gleichzeitiger Injektion der Gallensäure und des Pituitrins wird der Blutzuckergehalt von der 6. Stunde an im Vergleich mit dem bei alleiniger Zufuhr von Gallensäure gesteigert. Dieses Verhalten ähnelt sehr dem Ergebnis von Komuro (1927), das er erhielt, als er den Einfluss des Pituitrins auf die hypoglykämische Wirkung des Insulins beobachtete.

Nach diesem Versuche scheinen mir Gallensäure und Insulin gegen das Pituitrin die gleiche Wirkung zu besitzen.

II ÜBER DEN EINFLUSS DES PARASYMPATHICUSGIFTES AUF DIE HYPOGLYKÄMISCHE WIRKUNG DER GALLENSÄURE.

1 *Atropin.*

Bald nachdem ich dem Kaninchen 3.0 ccm einer 1% Cholatlösung verabreicht hatte, injizierte ich pro Kg Körpergewicht 0.2 mg Atropinsulfat in 1% Lösung subcutan. Natürlich überzeugte ich mich dabei vorher, dass schon 0.2 mg Atropinsulfat beim Kaninchen Hyperglykämie erzeugt hatte.

Aus der Tabelle IV kann man ersehen, dass das Atropin die hypoglykämische Wirkung der Gallensäure hemmt, indem der Blutzuckergehalt bei gleichzeitiger Zufuhr im Vergleich mit dem bei nur Gallensäurezufuhr einen vermehrten Wert zeigt. Das Atropin wirkt auf die Endigungen des parasympathischen Nervensystems lähmend und auf das centrale Nervensystem erregend. Die Hyperglykämie, die durch Zufuhr von grossen Mengen Atropin herbeigeführt wird, scheint mir nicht auf Lähmung der Nervenendigungen des parasympathischen Systems,

TABELLE III. Versuch mit Pituitrin.

Kaninchen		Chol- säure (g.)	Pitui- trin (cem)	Blutzucker %									
Nr.	Körper- gewicht (g.) u. Geschlecht			Vor		nach Stunden							
				1	2	3	4	5	6	7	8	24	
7.	2200 ♂	0.066	— 0.66 0.66	0.1081 0.1130 0.0943	0.0859 0.1082 0.0719	0.0833 0.1102 0.0780	0.0783 0.1003 0.0781	0.0824 — 0.0872	0.0919 — 0.0979	0.0897 — 0.1041	0.0918 — 0.1055	0.0910 — 0.1008	
8.	1930 ♂	0.053	— 0.58 0.58	0.1020 0.1008 0.1019	0.0935 0.0960 0.0899	0.0808 0.0803 0.0793	0.0820 0.0879 0.0814	0.0827 — 0.0869	0.0903 — 0.0934	0.0954 — 0.0996	0.0993 — 0.1013	0.0988 — 0.1011	
9.	2230 ♂	0.067	— 0.67 0.67	0.0984 0.0938 0.0998	0.0842 0.0924 0.0880	0.0798 0.0874 0.0789	0.0863 0.1001 0.0785	0.0863 0.1026 0.0826	0.0910 0.1048 0.0912	0.0919 — 0.1004	0.0947 — 0.1022	0.1007 — 0.0997	

TABELLE IV. Versuch mit Atropin.

Kaninchen		Chol- säure (g.)	Atropin (mg.)	Blutzucker %									
Nr.	Körper- gewicht (g.) u. Geschlecht			Vor		nach Stunden							
				1	2	3	4	5	6	7	8	24	
10.	2210 ♂	0.066	— 0.44 0.44	0.0993 0.1102 0.0974	0.0910 0.1134 0.0975	0.0898 0.1063 0.0915	0.0826 0.1081 0.0971	0.0863 — 0.1042	0.0842 — 0.1090	0.0924 — 0.1073	0.0995 — 0.1043	0.0995 — 0.1020	
11.	2010 ♂	0.03	— 0.4 0.4	0.0984 0.1102 0.0985	0.0858 0.1146 0.0993	0.0780 0.1191 0.1005	0.0818 0.1108 0.1038	0.0833 — 0.1009	0.0916 — 0.1000	0.0947 — 0.0997	0.1001 — 0.0996	0.0973 — 0.0982	
12.	1800 ♂	0.054	— 0.36 "	0.1015 0.1023 0.1063	0.0808 0.1030 —	0.0793 0.1099 —	0.0824 0.1129 —	0.0807 0.1066 —	0.0918 0.1037 —	0.0883 0.1038 —	0.0966 0.1037 —	0.1028 0.1029 —	

sondern auf der Erregung des Zentrums zu beruhen, wie das schon von Saito (1921) erklärt wurde.

Es ist höchst wahrscheinlich, dass auf diese Weise die hypoglykämische Wirkung der Gallensäure durch das Atropin gehemmt wird.

2. *Pilocarpin.*

Hier injizierte ich anstatt des Atropins pro Kg Körpergewicht 3.0 mg Pilocarpinchlorhydrat in 1% Lösung und 3.0 ccm einer 1% Cholatlösung dem Kaninchen subcutan gleichzeitig und verglich stündlich den Blutzuckergehalt mit dem bei Gallensäurezufuhr allein.

Die Tabelle V zeigt, dass auch das Pilocarpin die hypoglykämische Wirkung der Gallensäure hemmt, indem das Pilocarpin bei der von mir verwandten Menge beim Kaninchen Hyperglykämie erzeugt. Diese Hyperglykämie war bei Versuch 14 und 15 nicht auffallend, doch zeigt der Blutzuckergehalt bei gleichzeitiger Zufuhr im Vergleich mit dem bei alleiniger Gallensäurezufuhr Neigung zur Hyperglykämie. Das Pilocarpin erregt die Nervenendigungen des Parasympathicus.

Danach scheint mir die leichte Hemmung der hypoglykämischen Wirkung der Gallensäure durch die Erregung der Endigungen des parasympathischen Nervensystems bedingt zu sein.

III. ÜBER DEN EINFLUSS DER ALKALOIDE AUF DIE HYPOGLYKÄMISCHE WIRKUNG DER GALLENSÄURE.

1. *Morphin.*

Bei diesem Fall wurden pro Kg Körpergewicht 3.0 mg Morphinchlorhydrat in 1% Lösung mit 3.0 ccm einer 1% Cholatlösung dem Kaninchen gleichzeitig subcutan injiziert.

Aus Tabelle VI ist ersichtlich, dass der Blutzuckergehalt des Kaninchens bei gleichzeitiger Zufuhr von Gallensäure und Morphin im Vergleich mit dem bei alleiniger Gallensäurezufuhr einen sehr vermehrten Wert aufweist. Danach hemmt das Mor-

TABELLE V. Versuch mit Pilocarpin.

Kaninchen		Chol- säure (g.)	Pilocar- pin (mg.)	Blutzucker %									
				nach Stunden								Vor	
				1	2	3	4	5	6	7	8		
Nr.	Körper- gewicht (g.) u. Geschlecht												
13.	2200 ♂	0.066 "	— 6.6	0.0972 0.1029	0.0878 0.1084	0.0778 0.1045	0.0846 0.1004	0.0910 0.0992	0.0923 0.0927	0.0972 0.0976	0.1056 0.1026	0.0996 0.1009	
14.	2000 ♂	0.06 — 0.06	— 6.0 6.0	0.1007 0.0987 0.1002	0.0873 0.1293 0.0976	0.0792 0.1313 0.0918	0.0811 0.1205 0.0879	0.0880 — 0.0928	0.0990 — 0.0997	0.0977 — —	0.0983 — —	0.0984 — 0.0924	
15.	2210 ♂	0.066 — 0.066	— 6.6 6.6	0.0993 0.0984 0.0938	0.0952 0.1293 0.0882	0.0782 0.1345 0.0853	0.0798 0.1273 0.0917	0.0827 — 0.0974	0.0952 — 0.0994	0.0995 — 0.0992	0.0966 — 0.0990	0.1008 — 0.0983	

TABELLE VI. Versuch mit Morphin.

Kaninchen		Chol- säure (g.)	Mor- phin (mg.)	Blutzucker %									
				nach Stunden								Vor	
				1	2	3	4	5	6	7	8		
Nr.	Körper- gewicht (g.) u. Geschlecht												
16.	2150 ♂	0.065 — 0.065	— 6.5 6.5	0.1007 0.1110 0.1018	0.0924 0.1252 0.1027	0.0798 0.1282 0.1022	0.0829 0.1173 0.1022	0.0903 — 0.1034	0.0900 — 0.1029	0.0966 — 0.1033	0.1019 — 0.1004	0.0993 — 0.1009	
17.	2010 ♂	0.06 — 0.06	— 6.0 6.0	0.0929 0.0992 0.0996	0.0923 0.1168 0.0933	0.0806 0.1170 0.1038	0.0788 0.1083 0.1050	0.0870 — 0.1010	0.0893 — 0.0995	— — —	— — —	0.0952 — 0.1019	
18.	1980 ♂	0.059 "	— 5.9	0.1045 0.1015	0.1019 0.0998	0.0883 0.1103	0.0826 0.1160	0.0859 0.1167	0.0903 0.1021	— —	— —	0.1020 0.0988	

phind deutlich die hypoglykämische Wirkung der Gallensäure. Das Morphin wirkt auf das zentrale Nervensystem lähmend, und die Hyperglykämie bei Zufuhr von Morphin scheint nach Noma (1927) dadurch bedingt zu sein, dass das Adrenalin, das durch Sympathicusreizung im Blut vermehrt ist, die Glykogenmobilisation in der Leber veranlasst. Diese Sympathicusreizung kommt vielleicht durch Gleichgewichtsstörung der Funktion zwischen Grosshirnrinde und Zwischenhirn zustande.

Diese hyperglykämische Wirkung des Morphins hemmt die hypoglykämische Wirkung der Gallensäure.

2. *Cocain.*

Diesmal injizierte ich dem Kaninchen pro Kg Körpergewicht 7.0 mg oder 20.0 mg Cocainchlorhydrat in einer 1% Lösung mit 3.0 ccm einer 1% Cholatlösung gleichzeitig subcutan.

Die Tabelle VII_a zeigt, dass der Blutzuckergehalt bei gleichzeitiger Zufuhr von Cocain und Gallensäure im Vergleich mit dem bei Gallensäurezufuhr allein nach der Injektion anfangs einen verminderten Wert aufzuweisen scheint. Doch liegt die Abweichung innerhalb der Fehlergrenzen des Versuches. Dagegen ist im späteren Stadium der Blutzucker gesteigert.

In Tabelle VII_b sieht man, dass die Zufuhr des Cocains in der Menge von 20.0 mg pro Kg Körpergewicht die hypoglykämische Wirkung der Gallensäure hemmt, wenn diese mit dem Cocain in der Menge von 20.0 mg pro Kg körpergewicht gleichzeitig verabreicht wird. Das Cocain wirkt auf die Nervenendigungen des Sympathicus erregend. Danach scheint mir, dass das Cocain gegen die Gallensäure antagonistisch wirkt und der Blutzucker im späteren Stadium durch Sympathicusreizung im Vergleich mit dem bei alleiniger Zufuhr von Gallensäure gesteigert wird.

In der Tat verstärkt das Cocain die Wirkung des Adrenalins, und das Adrenalin wirkt gegen die Gallensäure antagonistisch.

3. *Coffein.*

Hier injizierte ich pro Kg Körpergewicht 0.05 gm oder 0.15 g

TABELLE VII_a Versuch mit Cocain.

Kaninchen		Chol- saure (g.)	Cocain (mg.)	Blutzucker %									
Nr.	Körper- gewicht (g.) u. Geschlecht			Vor	nach						Stunden		
		1	2		3	4	5	6	7	8	24		
19.	2170 ♂	0.065 — 9.065	— 15.3 15.3	0.0993 0.1002 0.1003	0.0972 0.1109 0.1002	0.0983 0.1076 0.0952	0.0827 0.0907 0.0851	0.0774 0.0794 0.0814	0.0864 0.0877 0.0864	0.0911 — 0.0977	0.0901 — 0.1012	0.0975 — — 0.0975	
	1930 ♂	0.058 "	— 13.5	0.0974 0.0993	0.0957 0.0942	0.0896 0.0934	0.0834 0.0871	0.0912 0.0882	0.0971 0.0913	0.0988 0.0901	0.0981 0.0957	— 0.0944 0.0960	
21.	1650 ♂	0.05 — 0.05	— 11.6 11.6	0.0991 0.1001 0.1020	0.0966 0.1041 0.1001	0.0947 0.0960 0.0938	0.0845 0.0950 0.0877	0.0932 0.0823 0.0913	0.0924 0.0884 0.0941	0.0963 — 0.0972	0.0967 — 0.0983	0.1011 — 0.1002	

TABELLE VII_b Versuch mit Cocain.

Kaninchen		Chol- säure (g.)	Cocain (g.)	Blutzucker %									
Nr.	Körper- gewicht (g.) Geschlecht			Vor	1		2	3	4	5	6	7	8
22.	2210 ♂	0.066 — 0.066	— 0.044 0.044		0.1152 0.1101 0.1113	0.1063 0.1170 0.1082	0.1001 0.1242 0.1117	0.0944 0.1272 0.1174	0.1004 0.1255 0.1141	0.0993 0.1227 0.1143	— — —	— — —	— — —
	23.	2030 ♂	0.061 — 0.061	— 0.042 0.042	0.1073 0.1029 0.1020	0.1050 0.1079 0.1023	0.0971 0.1124 0.1055	0.0907 0.1230 0.1069	0.0927 0.1224 0.1092	0.0991 — 0.1054	— — —	— — —	
24.		1970 ♂	0.059 — 0.059	— 0.04 0.04	0.1027 0.1049	0.0988 0.1016	0.0926 0.1107	0.0871 0.1139	0.0894 0.1102	0.0947 0.1097	0.0946 —	— — —	

Coffeinnatriumbenzoat in einer 10% Lösung mit 3.0 ccm einer 1% Cholatlösung gleichzeitig subcutan. Die eine Komponente des Coffeinnatriumbenzoats, die Benzoesäure, wirkt auf den Blutzucker des Kaninchens in keiner Weise. Daher verwendete ich zum Versuch Coffeinnatriumbenzoat.

Aus Tabelle VIII_a geht hervor, dass das Coffein auf die hypoglykämische Wirkung der Gallensäure ebenso wie Cocain wirkt. Bei diesem Versuch zeigt der Blutzuckergehalt nach 1–4 Stunden nach der Injektion von Coffein und Gallensäure im Vergleich mit dem bei Gallensäurezufuhr allein einen verminderten Wert. Aber auch hier liegt die Abweichung innerhalb der Fehlergrenzen des Versuches. Dagegen wird im späteren Stadium der Blutzucker gesteigert.

Aus Tabelle VIII_b ist ersichtlich, dass das Coffein in der Menge von 0.15 g pro Kg Körpergewicht die hypoglykämische Wirkung der Gallensäure hemmt, wenn es mit der Gallensäure gleichzeitig injiziert wird.

Danach darf man annehmen, dass das Coffein gegen die Gallensäure antagonistisch wirkt.

IV. ÜBER DEN EINFLUSS DER ALKALIEN UND ERDALKALIEN AUF DIE HYPOGLYKÄMISCHE WIRKUNG DER GALLENSÄURE.

1. *Chlorkalium.*

Hier injizierte ich dem Kaninchen pro Kg Körpergewicht 0.03 g Kaliumchlorid in einer 3% Lösung intravenös und zwar erst 2 Stunden nach subcutaner Verabreichung von 3.0 ccm einer 1% Cholatlösung pro Kg Körpergewicht. Der Blutzucker wurde dabei in kurzen Zeitintervallen bestimmt und mit dem bei alleiniger Zufuhr der Gallensäure verglichen.

Aus Tabelle IX ist ersichtlich, dass der Blutzuckergehalt bei gleichzeitiger Zufuhr von Gallensäure und Kalium im Vergleich mit dem bei alleiniger Zufuhr von Gallensäure einen verminderten Wert annimmt.

Danach wirkt Gallensäure mit dem Kalium synergetisch

TABELLE VIII_a Versuch mit Coffein.

Kaninchen		Chol- säure (g.)	Coffein (g.)	Blutzucker %									
				Vor		nach							
Nr.	Körper- gewicht (g.) u. Geschlecht			1	2	3	4	5	6	7	8	24	
25.	2175 ♂	0.065 — 0.065	— 0.11 0.11	0.0998 0.0972 0.1042 0.0961 0.0907	0.0901 0.0943 0.0816	0.0817 0.0869 0.0817	0.0822 0.0901 0.0797	0.0891 — 0.0920	0.0923 — 0.0937	0.0971 — 0.0954	0.0968 — 0.0972	0.0984 — 0.1001	
26.	2015 ♂	0.06 "	— 0.1	0.0991 0.0866 0.0975	0.0900 0.0875	0.0801 0.0833	0.0837 0.0901	0.0912 0.0949	0.0921 0.0983	0.0972 0.1002	0.0991 0.1011	0.1012 0.0982	
27.	2180 ♂	0.065 — 0.065	— 0.11 0.11	0.0993 0.0914 0.1050 0.0929 0.0972	0.0856 0.0921 0.0881	0.0797 0.0857 0.0793	0.0812 0.0901 0.0878	0.0937 — 0.0897	0.0956 — 0.0895	0.0981 — 0.0926	0.0977 — 0.0958	0.1013 — 0.0963	

TABELLE VIII_b Versuch mit Coffein.

Kaninchen		Chol- säure (g.)	Coffein (g.)	Blutzucker %									
				Vor		nach							
Nr.	Körper- gewicht (g.) u. Geschlecht			1	2	3	4	5	6	7	8	24	
28.	1960 ♂	0.059 — 0.059	— 0.29 0.29	0.1068 0.1092 0.1072	0.1011 0.1214 0.1094	0.0917 0.1241 0.1107	0.0906 0.1228 0.1046	0.0953 0.1139 0.1013	0.0971 — —	— — —	— — —	— — —	
29.	2200 ♂	0.066 — 0.066	— 0.33 0.33	0.1027 0.1019 0.1045	0.0949 0.1127 0.1029	0.0847 0.1192 0.1022	0.0909 0.1109 0.1019	0.0904 0.1103 0.0973	— — —	— — —	— — —	— — —	
30.	1850 ♂	0.056 "	— 0.28	0.1002 0.1026	0.0947 0.1052	0.0869 0.1098	0.0863 0.1072	0.0931 0.1066	— —	— —	— —	— —	

TABELLE IX. Versuch mit Chlorkalium.

Kaninchen		Chol- säure (g.)	Chor- kalium (g.)	Blutzucker %												
Nr.	Körper- gewicht (g.) u. Geschlecht			nach Stunden												
		Vor		1	2	2 _{30'}	2 _{45'}	3	3 _{20'}	3 _{40'}	4	4 _{30'}	5	24		
31.	2280 ♂	0.068	—	0.1017	0.0954	0.0857	—	—	0.0849	—	—	0.0885	—	0.0959	0.1097	
		—	0.063	0.1105	—	—	0.1013	0.1009	0.1001	0.0988	0.0954	—	—	—	—	
		0.068	0.063	0.1101	0.1021	0.0983	0.0879	0.0837	0.0819	0.0862	0.0881	0.0913	0.0937	0.1015	0.1084	
32.	2120 ♂	0.064	—	0.1045	0.0915	0.0876	—	—	0.0860	—	—	0.0873	—	—	—	
		—	0.064	0.0926	—	—	0.0920	0.0911	0.0913	0.0905	0.0907	0.0909	—	—	—	
		0.064	0.064	0.1008	0.0923	0.0889	0.0845	0.0801	0.0853	0.0872	0.0884	0.0899	0.0933	0.0984	0.1057	
33.	2200 ♂	0.066	—	0.1007	0.0974	0.0903	—	—	0.0879	—	—	0.0847	—	0.0936	—	
		,,	0.066	0.0992	0.0938	0.0879	0.0853	0.0833	0.0861	0.0877	0.0881	0.0896	0.0900	0.0913	0.1081	

TABELLE X. Versuch mit Chlorcalcium.

Kaninchen		Chor-säure (g.)	Chor-calcium (g.)	Blutzucker %												
Nr.	Körper-gewicht (g.) Geschlecht			Vor		1	2	2 _{30'}	2 _{45'}	3	3 _{20'}	3 _{40'}	4	4 _{30'}	5	24
34.	1700 ♂	0.068	—	0.1139	0.0972	0.0894	—	0.1208	0.1291	0.0864	—	—	0.0897	—	0.0993	0.1129
		—	0.14	0.1175	—	—	—	0.1208	0.1291	0.1273	0.1251	0.1195	0.1163	—	—	—
		0.068	0.14	0.1148	0.0996	0.0991	—	0.1020	0.1103	0.1127	0.1149	0.1114	0.1106	0.1092	0.1095	0.1102
35.	2050 ♂	0.082	—	0.1052	0.0973	0.0897	—	—	—	0.0866	—	—	0.0872	—	—	—
		—	0.16	0.1082	—	—	—	0.1198	0.1247	0.1291	0.1304	0.1272	0.1199	—	—	—
		0.082	0.16	0.1031	0.0947	0.0882	—	0.1080	0.1073	0.1169	0.1152	0.1117	0.1096	0.1072	0.1009	0.1027
36.	2130 ♂	0.085	—	0.0998	0.0912	0.0881	—	—	—	0.0781	—	—	0.0871	—	—	—
		,,	0.17	0.1002	0.0946	0.0892	—	0.1073	0.1105	0.1157	0.1209	0.1141	0.1104	0.1090	0.1001	0.0987

auf den Blutzucker des Kaninchens. Es ist bekannt, dass das Kalium auf das parasympathische Nervensystem erregend wirkt und den Blutzucker herabsetzt.

2. *Chlorcalcium.*

Erst 2 Stunden später, nachdem ich dem Kaninchen 4.0 ccm einer 1% Cholatlösung verabreicht hatte, injizierte ich pro Kg Körpergewicht 0.08 g Chlorcalcium in einer 20% Lösung intravenös und beobachtete in kurzen Intervallen den zeitlichen Verlauf des Blutzuckers, den ich dann mit dem des Gallensäureversuches verglich.

Tabelle X zeigt, dass die durch Gallensäurezufuhr verursachte Hypoglykämie, durch die Zufuhr von Chlorcalcium gesteigert wird, indem das Calcium die hypoglykämische Wirkung der Gallensäure hemmt. Das beweist, dass die Gallensäure auf den Blutzuckergehalt antagonistisch wirkt. Es ist allgemein bekannt, dass das Calcium auf den Sympathicus erregend wirkt und den Blutzucker mehr oder weniger steigert.

Danach scheint mir die Gallensäure gegen das Calciumion im Sinne einer Sympathicuslähmung antagonistisch zu wirken.

3. *Chlormagnesium.*

Nach der Injektion von 3.0 ccm einer 1% Cholatlösung pro Kg Körpergewicht injizierte ich 2 Stunden später 0.08 g Chlormagnesium in 20% Lösung pro Kg Körpergewicht intravenös. Darauf untersuchte ich den Blutzuckergehalt in kurzen Zeitintervallen und verglich ihn mit dem Gehalt bei alleiniger Gallensäurezufuhr.

Aus der Tabelle XI geht hervor, dass die durch Zufuhr von Gallensäure verursachte Verminderung des Blutzuckers durch die Injektion von Chlormagnesium einer Steigerung Platz macht, indem die hypoglykämische Wirkung der Gallensäure durch das Magnesium gehemmt wird.

Das Magnesium wirkt also wie Calcium gegen die Gallensäure antagonistisch.

TABELLE XI.
Versuch mit Chlormagnesium.

Kaninchen		Cholsäure (g.)	Chlormagnesium (g.)	Blutzucker % nach Stunden											
Nr.	Körpergewicht (g.) u. Geschlecht			Vor	1	2	2,30'	2,45'	3	3,20'	3,40'	4	4,30'	5	24
37.	1870	0.056	—	0.1091	0.0996	0.0891	—	—	0.0871	—	—	0.0882	—	—	—
	♀	—	0.15	0.1012	—	—	0.1100	0.1217	0.1276	0.1296	0.1205	0.1191	—	—	—
		—	0.056	0.15	0.1060	0.0962	0.0877	0.1009	0.1040	0.1097	0.1127	0.1106	0.1087	0.1003	0.0994
38.	2110	0.063	—	0.1070	0.0976	0.0894	—	—	0.0889	—	—	0.0898	—	—	—
	♀	—	0.17	0.1194	—	—	0.1203	0.1275	0.1324	0.1371	0.1263	0.1213	—	—	—
		—	0.036	0.17	0.1110	0.1002	0.0896	0.0993	0.1033	0.1167	0.1159	0.1094	0.1035	0.1051	0.1077
39.	1950	0.059	—	0.1085	0.0961	0.0857	—	—	0.0841	—	—	0.0895	—	—	—
	♂	„	0.16	0.1116	0.0920	0.0871	0.0914	0.1101	0.1173	0.1228	0.1181	0.1079	0.1088	0.1121	0.1105
		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Danach scheint mir die Gallensäure wie das Insulin (Oda 1927) gegen die Erdalkalien, wie Calcium und Magnesium, antagonistisch zu wirken.

ZUSAMMENFASSUNG.

1. Das Insulin fördert die hypoglykämische Wirkung der Cholsäure, während das Adrenalin sie hemmt.

Das Hypophysenpräparat Pituitrin beeinflusst die hypoglykämische Wirkung der Cholsäure nicht weiter oder hemmt sie höchstens etwas.

2. Die Parasympathicusgifte Atropin und Pilocarpin hemmen die hypoglykämische Wirkung der Cholsäure.

3. Die Alkaloide Morphin, Cocain und Coffein hemmen die hypoglykämische Wirkung der Gallensäure, und zwar tritt diese antagonistische Wirkung gegen die Cholsäure bei Morphin stärker als bei Cocain und Coffein auf.

4. Erdalkaliensalze, wie Calciumchlorid und Magnesiumchlorid, hemmen die hypoglykämische Wirkung der Cholsäure, und zwar wirkt das Calcium stärker als Magnesium.

Dagegen verstärkt das Kaliumchlorid die hypoglykämische Wirkung.

Die Kosten für diese Arbeit wurden teils aus der Stiftung des Unterrichtsministeriums zwecks Förderung der Wissenschaften bestritten, so gebührt warmer Dank dem Unterrichtsministerium.

Zum Schlusse ist es mir eine angenehme Pflicht, Herrn Prof. Dr. T. Shimidzu für seine Leitung und liebenswürdige Unterstützung meinen herzlichen Dank auszusprechen.

LITERATUR.

- Bang I. (1922) Mikromethoden zur Blutuntersuchungen 30.
Barasch E. (1924) Kl. Woch. 3Jg. 1618.
Blum F. (1901) Deutsch. Arch. f. klin. Med. **71**. 146.
„ „ (1902) Pflügers Arch. **90**. 617.
Borchardt (1908) Deutsch. med. Wochenschr. Nr. **21**. 946.

- Bornstein u. Vogel (1921) Bioch. Zeitschr. **118.** 122.
 „ „ „ (1922) „ „ **122.** 274.
 „ „ „ „ „ „ **126** 56.
 „ „ Müller „ „ „ „ 64.
 Cushing (1910) Americ. Journ. of med. Science. s. 473.
 Franchini (1910) Berl. klin. Wochenschr. Nr. **15.** 670.
 Fröhlich A. u. Loewi O. (1910) Arch. f. exp. Path. u. Pharm. **62.**
 Ito, K. (1924) Kyoto Igakuzasshi **21.** Nr. 12.
 Kinoshita (1926) Chugai Ijishimpo Nr. 1111-1114.
 Komuro, M. (1927) Folia Endocrinolog. Japonica **3.** Nr. 3. 658.
 Kraus, F. u. Zondek S. G. (1924) Kl. Woch. 3Jg. 707.
 Kylin, u. Nyström (1925) Zeitschr. f. ges. exp. Med. **45.**
 Macleod (1908) Americ. Journ. of Physiol. **22.** 373.
 Macnider u. Mathews (1907-1908) Americ. Journ. of Physiol **20.** 323.
 Maebo, G. (1921) Kyoto Igakuzasshi **18.** 479.
 Magenta M. A. u. Biasotti (1924) C. R. du la soc. de Biol. **90.** 249.
 Mc.Guigan (1916) Journ. of pharm. and experm. Therapie **3.** 407.
 Meltzer (1909) Deutsch. med. Woch. Nr. **35.** 1963.
 Misaki K. (1927) Journ. of Biochem. **8.** 235.
 Narabayashi, H. (1920) Chugai Ijishimpo Nr. 970-973.
 Noma, A. (1927) Okayama Igakkai Zasshi **39.** 1592.
 Nosaka, T. (1925) Folia Endocrinolog. Japonica **1.** 624.
 Oda N. (1927) Folia Endocrinolog. Japonica **3.** 630.
 Pitini (1908) Arch. internation. de Pharmacodyn. et de Therapie **18.**
 Raphael (1899) Deutsch. med. Wochenschr. Nr. **28.** 451.
 Rudisch (1909) Arch. f. Verdauungskrankheit **15.** 469.
 Saito (1921) Keyo Igakuzasshi **1.** 943.
 Senga H. (1924) Toyo Igakuzasshi **2.** Nr. 1.
 Stenström (1914) Bioch. Zeitschr. **58.** 472.
 Stewart u. Rogoff (1922) Journ. of pharm. and experm. Therapie **19.**
 97.
 Stewart u. Rogoff (1923) Americ. Journ. of Physiol. **62.** 93.
 „ „ „ „ „ „ „ „ **65.** 331.
 Zondek S. G. u. Benatt A. (1924) Zeitschr. f. die gesamt. exp. Med.
43. 231.
 Zondek S. G. (1925) Kl. Wochenschr. **1925.** Nr. 19.
 Wakabayashi E. (1926) Nippon Naikagakkai Zasshi **12.** Nr. 91.
 Wiechmann (1920) Pflügers. Arch. **182.** 74.

ÜBER DIE GALLENSÄUREBILDUNG. II. AVITAMINOSEN UND GALLENSÄUREAUSSCHIEDUNG IN DER GALLE.

VON

KANAE MURAKAMI.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Okayama.
Vorstand: Prof. Dr. T. Shimizu.)

(Eingegangen am 25. März 1928.)

Weil das Cholesterin der Gallensäure chemisch strukturell nahe steht, haben Goodmann (1907), Foster, Hooper und Whipple (1919) beim Hunde den Einfluss von Cholesterin auf die Gallensäureausscheidung in der Galle untersucht, um zu sehen, ob die Gallensäure aus dem Cholesterin stammt.

Leider verlief der Versuch ergebnislos. Im Pflanzenreiche kommen viele Sterine vor, die chemisch strukturell zu dem Cholesterin oder der Gallensäure in inniger Beziehung stehen. Weiter hat neuerdings Takahashi das Vitamin A aus dem Lebertran isoliert und es auch in die Gruppe der Sterine eingereiht. Nach den Untersuchungen von Takahashi ist das Vitamin A ein hochmolekularer, ungesättigter, wasserstoffreicher, zweiwertiger Alkohol, der den Polyterpenen nahesteht. Er hat es Biosterin genannt.

Davon ausgehend, führte Yonemura (1927) beim Hunde, der bei unterbundenem Ductus choledochus eine permanente komplette Gallenblasenfistel trug, eine fortlaufende Bestimmung der Gallensäure in der Galle aus, um den Einfluss von Vitamin A auf die Gallensäureausscheidung in der Galle zu suchen.

Er fand, dass das Vitamin A beim Hunde die Gallen- und Gallensäureausscheidung allmählich vermehrt, wenn es subkutan eingeführt wird.

Neulich bestätigte Sugano (1927), dass die Beobachtung von Yonemura auch für den Menschen gilt, selbst wenn dieser

an Cholelithiasis leidet. Er fand weiter, dass die perorale Zufuhr von Eigelb bei diesem Kranken die Gallensäureausscheidung in der Galle vermehrt, aber die Menge der Galle nicht. Dabei erklärte er, dass diese vermehrte Gallensäureausscheidung dem Vitamin A, das reichlich im Eidotter enthalten ist, zuzuschreiben sei. In diesem Sinne habe ich die Gallensäureausscheidung aus der Leber von Meerschweinchen untersucht, die lange Zeit Vitamin A-freie Nahrung erhalten hatten, um die Frage zu einem gewissen Abschluss zu bringen, ob das Vitamin A die Quelle der Gallensäure sei und dieses vom Biosterin herstamme.

UNTERSUCHUNGSMETHODE.

Als Versuchstiere verwendete ich junge Meerschweinchen, weil die Gallenblase derselben im Vergleich mit ihrer Körpergrösse weit grösser als die anderer Tiere ist. Der Einfluss der Nahrungszufuhr auf die Menge der ausgeschiedenen Galle ist schon von vielen Autoren, wie Schwamm (1844), Bruno (1898), Kunkel (1875), Spiro (1888) und neuerdings Wino-grado (1924), untersucht worden. Es steht fest, dass zwischen Gallenabsonderung und Nahrungsaufnahme eine bestimmte Beziehung besteht, und dass ferner die Art der Nahrung von Einfluss ist.

Bei den Versuchen gab ich als Vitamin A-freie Nahrung täglich die folgende: 30g getrocknete Okara, welche erst 4 Stunden lang im Autoklav unter Druck bei 150°C erhitzt und einen Tag lang mit siedendem Äther und Alkohol extrahiert und getrocknet wurde, um das darin enthaltene Vitamin A zu entfernen, 0.1 g Oryzanin (Vitamin B), 1.5 ccm Orangensaft (Vitamin C), 0.5g Salzmischung nach Mc. Collum und 50 ccm Mineralwasser.

Als Kontrolle verabreichte ich einer Gruppe Meerschweinchen täglich folgende gewöhnliche Nahrung: 30 g gewöhnlich getrocknete Okara, 0.1 g Oryzanin, 1.5 ccm Orangensaft, 0.5 g Salzmischung und 50 ccm Wasser. Während der Versuche wog ich täglich zu einer bestimmten Zeit das Körpergewicht des

Tieres und beobachtete genau alle Ausfallserscheinungen, wie Abnahme des Körpergewichts, Haarausfall, Glanzlosigkeit der Harre, Konjunktivitis, Keratitis, katarrhalische Erscheinungen des Verdauungskanals, Mattigkeit und Appetitlosigkeit.

Alle diese Erscheinungen sind bekanntlich auf den Mangel an Vitamin A im Körper zurückzuführen. Nach Verlauf einer bestimmten Zeit, in der ich mich einiger Ausfallserscheinungen des Versuchstiers vergewissert hatte, unterband ich zuerst unter Bauchschnitt den Ductus choledochus von der Darmseite her, saugte durch Punktion mit der Injektionsnadel die Galle der Gallenblase ab und nähte dann die Glaskanüle in die Gallenblase ein. Auf diese Weise sammelte ich 6 Stunden lang die Galle aus der Fistel und bestimmte gasometrisch die Gallensäure in der so gesammelten Galle nach Foster und Hooper. Mit den Kontrolltieren wurde in gleicher Weise vorgegangen. Die so operierten Tiere starben meist nach 10 Stunden, während die Kontrolltiere alle ungefähr 20 Tage lang nach der Operation noch lebten. Die Resultate sind in den folgenden Tabellen I-VI zusammengestellt. In einigen Versuchen spritzte ich dem Tier, welches eine bestimmte Zeit mit Vitamin A-freier Nahrung gefüttert worden war, 0.1 g Biosterin in 1 ccm Olivenöl subkutan ein und untersuchte dann die Gallensäuremenge in der Galle desselben Tieres am nächsten Tag und verglich diese Menge mit der des nicht injizierten Tieres.

Ich möchte an dieser Stelle dem Rikagaku Institut, das mir das gereinigte Biosterin lieferte, meinen besten Dank aussprechen.

Aus den Tabellen I, II, IV ist ersichtlich, dass die mit Vitamin-A freier Nahrung gefütterten Meerschweinchen nach 13-26 Tagen starke Abnahme des Körpergewichts, Haarausfall und einige davon sogar katarrhalische Erscheinungen des Auges und Darmes aufweisen. Einige Tiere starben während des Versuches durch Schwäche. Dagegen zeigen die Kontrolltiere keine avitaminose Erscheinungen, weder Gewichtsabnahme noch Haarausfall und katarrhalische Erscheinungen des Auges oder des Darmes, wie aus der Tabelle III und Nr. 11 der Tabelle IV ersichtlich

TABELLE. I.
Körpergewicht des Versuchstieres.

Nr. Datum	1 ♀	2 ♀	3 ♂	4 ♀	5 ♂	6 ♀	7 ♀	8 ♀	9 ♂	10 ♂	11 ♀	12 ♀
25/XI	510	470	520	560	520	525	415	405	480	390	640	1
26	520	485		575		535	410	400	490	380	645	1
27	500	455	510	555	530	500	420	395	480	370	640	630
28	495	440	509	550	529	„	410	„	295	375	630	633
29	500	„	490	„	500	490	400	390	„	„	640	640
30	495	445	480	545	490	455	390	395	500	370	660	645
1/XII	490	450	475	540	485	480	385	„	„	„	630	630
2	500	465	480	537	480	485	395	380	490	375	„	610
3	„	450	470	545	485	480	365	360	480	365	610	625
4	„	„	„	535	„	„	360	350	455	„	600	625
5	495	435	455	530	„	465	355	355	435	345	590	600
6	485	375	„	„	490	„	„	„	415	320	565	„
7	470	320	430	510	460	455	355	315	388	310	570	595
8	455	„	400	470	450	440	310	320	395	300	555	565
9	450	350	405	450	„	425	305	285	370	290	545	570
10	430	360	385	420	425	410	295	„	360	275	„	555
11	420	355	365	380	405	390	265	270	350	Tod	530	545
12	400	320	345	355	370	395	Tod	260	340		„	„
13	375	335	325	345	360	370		270	320		500	530
14	365	330	310	330	340	355			300		490	Tod
15	360	325	325		345	340					450	
16	355				340	330			310		465	
17									300		455	
18									300		465	
19											455	
20											455	
Haar- ausfall	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Augen- befund	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Diarrhoe	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+

♂: Männliches, ♀: Weibliches, +: Positiver Befund, -: Negativer
++: Ziemlich positiver, +++: Stark positiver

TABELLE II.
Körpergewicht des Versuchstieres.

Nr. Datum	13 ♂	14 ♂	15 ♂	16 ♂	17 ♂	18 ♀	19 ♂	20 ♀	21 ♀	22 ♀	23 ♀	24 ♀
27/XI	410											
28	405	420	405	420	400							
29	410	415	410	410	395							
30	405	420	405	„	380	660	325	615				
1/XII	„	415	400	415	390	650	320	620	533	620	600	610
2	„	„	„	„	„	655	„	615	„	610	592	595
3	410	410	„	„	„	650	„	620	510	615	590	610
4	„	415	410	„	„	660	„	„	520	„	590	610
5	405	405	405	„	385	645	330	605	480	605	595	595
6	360	„	„	400	375	„	345	602	480	610	600	580
7	370	400	400	405	360	620	335	570	490	595	610	590
8	355	375	370	385	350	610	320	590	495	580	600	585
9	370	380	380	380	355	605	300	525	515	570	590	570
10	340	375	375	375	345	610	295	630	527	560	575	560
11	350	365	370	360	335	605	285	590	540	540	570	565
12	340	350	355	350	345	600	385	295	515	520	560	575
13	„	355	„	355	320	585	210	590	500	„	548	540
14	320	340	340	365	295	560	235	570	485	380	545	555
15	300	„	320	355	285	545	215	588	470	355	530	540
16	280	335	Tod	Tod	290	530	200	565	450	Tod	535	530
17		345				510	190	550	420		530	510
18						Tod	180	475	400		500	500
19							170	480	Tod		500	500
20							155	480			510	495
21								475			510	485
22								455			510	485
23								450			495	480
24								524			475	470
Haar- ausfall	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++	++
Augen- befund	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Diarrhoe	-	-	-	-	+	+	+	++	-	-	++	+++

TABELLE III.

Körpergewicht.

Nr. Datum	25 ♂	26 ♂	27 ♂	28 ♂	29 ♂	30 ♂	31 ♀	32 ♂
1/XII	390	300	330	355	385	430	605	420
2	400	290	340	365	375	420	600	410
3	395	280	330	355	360	430	600	410
4	390	290	325	340	360	410	590	410
5	395	300	340	300	350	415	585	415
6	390	310	325	Tod	340	415	590	410
7	400	300	320		300	395	580	400
8	390	310	335		Tod	400	600	400
9	370	300	340			400	600	400
10	355	295	320			405	590	405
11	350	280	315			410	585	415
12	349	280	315			400	600	420
13	340	295	320			395	590	415
14	355	290	315			380	595	405
15	360	295	310			395	580	410
16	370	285	320			410	570	425
17	360	290	310			400	580	415
18	355	300	305			390	575	420
19	355		300			380	565	410
20	360						570	420
21	360						560	593
22	355						560	400
23	355						555	410
24	350						540	
Haar- ausfall	—	—	—	—	—	—	—	—
Augen- befund	—	—	—	—	—	—	—	—
Diarrhoe	—	—	—	—	+	—	—	—

TABELLE IV.
Körpergewicht des Versuchstieres.

Nr. Datum	1 ♀	2 ♀	3 ♀	4 ♀	5 ♀	6 ♀	7 ♀	8 ♀	9 ♀	10 ♀	11 ♀
1/XI	700	585	620	545	535	649	520	520	535	500	450
2	705	580	620	535	520	650	510	518	535	496	/
3	700	570	610	508	515	640	495	500	540	480	/
4	690	575	615	496	520	620	500	475	530	460	/
5	695	565	600	485	500	630	490	440	520	440	455
6	680	570	590	491	495	610	475	428	530	450	/
7	670	550	575	462	485	590	480	428	530	450	/
8	650	540	560	452	495	585	470	415	520	430	/
9	630	530	570	437	480	570	450	415	500	405	/
10	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
11	600	510	570	406	475	550	430	409	490	400	470
12	590	490	560	410	455	535	410	393	470	380	/
13	580	470	540	410	430	520	395	375	460	Tod	/
14	560	455	430	425	440	500	378	370	455		/
15	530	430	510	428	442	495	360	357	430		460
16	515	410	500	430	450	470	370	335	410		/
17	495	430	485	430	455	450	350	315	395		/
18	470	410	460	430	455	450	350	Tod	375		470
19	440	400	430	405	440	400	340		370		/
20	410	400	395	395	420	830	330		355		Kontrolle
21	395	410	370	395	430	365	320		360		
22	Tod	380	350	380	410	380			350		
23		370		365	400	360			340		
24		365		350	380	355			340		
25				340		350			340		
26				Tod					325		
Haarausfall	++	++	++	+++	+++	++	+	+++	+++	++	-
Augenbefund	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Diarrhoe	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-

TABELLE V.
Versuch I.

Nr.	Datum	Ausgeschiedene Gallenmenge cem	Spec. Gewicht	Aminostick- stoff. mg.		Taurocholsäure. mg. in 6 Stunden	Bemerkungen.
				in 1 cc Galle	in 6 Stunden.		
1	16/ ^{XLI}	8	1012	0.041	0.328	12.044	Avitaminose
2	15	4	1010	0.039	0.156	5.728	„
3	„	5	1012	0.040	0.200	7.344	„
4	14	6.5	1011	0.046	0.299	10.979	„
5	18	5.2	1012	0.032	0.166	6.095	„
6	„	5.4	1013	0.042	0.232	8.519	„
8	13	10	1013	0.043	0.430	15.789	„
9	18	8.5	1011	0.040	0.344	12.631	„
11	20	0.7	/	0.040	/	/	{ Avitaminose. 20/XII Bio- sterin 0.1 g in 1 cem Olive- nöl subkutan. Die Galle durch Punktion erhalten.
13	16	6	1012	0.043	0.258	9.473	Avitaminose
14	22	0.6	/	0.037	/	/	{ Avitaminose. 22/XII Bio- sterin 0.1 g in 1 cem Oliven- öl subkutan. Die Galle durch Punktion erhalten.
17	16	7.5	1011	0.037	0.277	10.171	Avitaminose
19	20	6.2	1012	0.043	0.268	9.640	„
20	24	10	1015	0.102	1.020	37.454	{ Avitaminose. 23/XII Biosterin 0.1 g in 1 cem Olivenöl sub- kutan. 24/XII Operation.
23	24	8	1012	0.085	0.680	24.969	{ Avitaminose. 23/XII Biosterin 0.1 g in 1 cem Olivenöl subkutan. 24/XII Operation.
24	24	12	1014	0.068	1.176	43.182	{ Avitaminose. 23/XII Biosterin 0.1 g in 1 cem Olivenöl subkutan. 24/XII Operation.
25	24	15	1014	0.058	0.870	31.946	Kontrolle
26	18	19	1014	0.057	1.073	39.460	„
27	19	21	1012	0.060	1.260	46.267	„
30	19	17	1013	0.063	1.071	39.327	„
31	24	19	1013	0.053	1.007	36.977	„
32	23	14	1014	0.054	0.756	27.760	„

TABELLE VI.

Versuch II.

Nr.	Datum	Ausgeschiedene Gallenmenge. cc.	Spec. Gewicht	Aminostickstoff. mg.		Taurocholsäure. mg. in 6 Stunden	Bemerkungen.
				in 1 cc Galle	in 6 Stunden		
2	24/XI	5	1011	0.043	0.215	7.89	Avitaminos.
5	„	4	1011	0.040	0.160	5.87	„
6	25	4.2	1012	0.049	0.205	7.52	„
7	21	6	1012	0.039	0.234	8.59	„
9	26	8.1	1012	0.040	0.324	11.89	„
10	19	15	1011	0.059	0.885	32.49	Kontrolle.

ist. Die Tabellen V und VI zeigen, dass die Gallensäuremenge in der 6 stündigen Galle des mit Vitamin-A-freier Nahrung gefütterten Tieres im Vergleich mit der des Kontrolltieres ohne Ausnahme viel geringer ist und ebenso die Gallenmenge. Die Gallensäuremenge des mit Vitamin A-freier Nahrung gezüchteten Tieres beträgt das $\frac{1}{5} - \frac{1}{7}$ der Menge des Kontrolltieres, wenn auch die Züchtungszeit der beiden ungefähr gleich sind.

Das gilt auch für die Gallenmenge. In diesem Fall beträgt die des Versuchstieres ungefähr das $\frac{1}{2} - \frac{1}{3}$ der Menge des Kontrolltieres. Es ist sehr merkwürdig, dass die Gallensäure in der in 6 Stunden gesammelten Galle des Tieres, dem Biosterin injiziert worden und welches ich vorher mit Vitamin-A-freier Nahrung gefüttert hatte, im Vergleich mit der des nicht injizierten Tieres viel stärker vermehrt ist, wie aus den Versuchen Nr. 20, 23 und 24 der Tabelle V hervorgeht.

Die Gallensäuremenge in der Galle des mit Biosterin behandelten Tieres, welches vorher mit Vitamin A-freier Nahrung gezüchtet worden, ist fast gleich der des Kontrolltieres. Das sieht man aus den Versuchen Nr. 20, 23, 24 und 25, 26, 27, 30,

31, 32 der Tabelle V.

Diese Gallensäurebestimmung in der Galle wurde am nächsten Tag nach der subkutanen Zufuhr des Vitamins A ausgeführt. Das beweist, dass die Beobachtung von Yonemura (1927), nach der die subkutane Zufuhr von Vitamin A bei normalen und hungernden Hunden mit Gallenblasenfistel vermehrte Gallensäureausscheidung in der Fistelgalle zeigt, richtig ist.

Aus meinem Versuch kann man schliessen, dass die Aufnahme Vitamin A-freier Nahrung verminderte Gallen- bzw Gallensäureausscheidung zur Folge hat.

Ich möchte nach diesen Tatsachen annehmen, dass das Vitamin A die Quelle der Gallensäure sei und diese vom Biotin herkommen dürfte.

ZUSAMMENFASSUNG.

Aus den Versuchsergebnissen kann man schliessen, dass die Gallen und Gallensäureausscheidung beim Meerschweinchen sich vermindert, wenn es der Nahrung an Vitamin A fehlt und diese Gallen- und Gallensäureverminderung durch subkutane Zufuhr von Vitamin A wieder zur Norm zurückgeführt werden kann.

Zum Schluss möchte ich Herrn Prof. Dr. T. Shimizu für seine freundliche Anleitung bei meiner Arbeit herzlichst danken.

Ebenso schulde ich vielen Dank Herrn S. Masuko, der mir manche Schwierigkeit überwinden half. Auch danke ich dem Unterrichtsministerium herzlichst für das mir gütigst gewährte Stipendium.

LITERATUR.

- Bruno (1898), St. Petersburger med. Wochenschr. Beil s. 13.
Foster u. Hooper (1919), J. of biolog. Chem. **38**. 359.
Goodmann (1907), Hofmeisters Beiträge. **9**. 91.
Hayashi Y. (1924), Kyoto Igakukai Zasshi **21**. 799.
Kunkel (1875), Pflügers Arch. **14**. 344.
Sugano (1927), J. of Biochem. **7**. 457.

Spiro (1888), Dubois-Reymonds Arch. f. physiolog. Supplementband. S. 50.

Schwamm (1844), Arch. f. Physiolog.

Winogradow (1924), Pflügers Archiv. **7**. 205. 590.

Yonemura S, (1927). J. of Biochem. **7**. 101.

ÜBER DIE KENNTNIS VON DER FISCHGALLE. III. DIE GALLE VON CYPRINUS CARPIS, CARASSIUS AURATUS, AUGUILLA JAPONICA UND ANAGO ANAGO.

VON

TAKUICHI HATAKEYAMA UND TAKEJI OKAMURA.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Okayama
Vorstand: Prof. Dr. T. Shimizu.)

(Eingegangen am 18. April 1928.)

In der Hoffnung, Aufschlüsse über den Zusammenhang zwischen Nahrung und Gallensäure, zu gewinnen, sind viele Autoren seit Jahren mit der Galle der verschiedensten Tiere beschäftigt. Bis heute ist aber nur bekannt, dass die Gallensäure in der Galle je nach Art der Tierspecies ganz verschieden ist.

Über die Gallensäuren von Fischgalle liegen jetzt ziemlich viele Angaben vor. Zuerst hatten Bensch (1848) u. Strecker (1849) aus dem reichlicheren Schwefelgehalt der Fischgalle (Hecht, Karpfen u. Weissfisch) geschlossen, dass die Galle dieser Fische Taurocholate enthalte. In neuerer Zeit haben viele Autoren wie Ikoma (1927), Hosokawa (1927), Shoda (1927), Kobayashi (1927), Oikawa (1925), und Teraoka (1928) aus der Galle verschiedener Fische Cholsäure isoliert.

Aus oben erwähntem Grunde haben auch wir seit dem letzten Jahre die Galle von Karpfen, Funafisch, Aal, und Anagofisch untersucht, und gefunden, dass die Cholsäure in der Galle dieser Fische hauptsächlich vorkommt. Aus der Galle von Karpfen und Funafisch haben wir auch Taurin isoliert und daher scheint es uns wahrscheinlich, dass in der Galle von Karpfen und Funafisch Taurocholsäure vorkommt.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE.

Aus der durch Alkohol vom Schleim befreiten Galle wurde der Alkohol durch Destillation entfernt und die Galle durch

Natriumhydroxyd gut verseift. Aus dem Reaktionsgemisch wurde nach der Methode von Langheld, Pregl und Buchtala (1908, 1911) die Gallensäure kristallisiert gewonnen. Die Ausbeute aus der Funafischgalle (450 ccm) betrug ca 6,8 g, die aus der Karpfengalle (100 ccm) ca 0,3 g, aus 400 ccm Aalgalle wurden ca 12 g, aus 300 ccm Anagofischgalle ca 9 g Gallensäure erhalten.

Alle diese Gallensäuren kristallisierten aus verdünntem Alkohol in Nadeln. Der bei 110°C in Vakuum getrocknete Kristall schmilzt bei 197°C. Er ist in Alkohol, Eisessig und Aceton leicht löslich, nicht aber in Wasser und Petroläther. Er schmeckt bitter und gab prachtvolle Pettenkofer'sche, Mylius'sche Reaktion.

1) aus Funafischgalle

Titration: 0,1 g Substanzen brauchten 2,41 ccm n/10

NaOH Äquivalent für $C_{24}H_{40}O_5$ Ber. : 408

Gef. : 414

Analyse: 0,102 g Substanzen gaben 0,2637 g CO_2 und

0,0856 g H_2O $C_{24}H_{40}O_5$ Ber. C 70,54% H 9,87%

Gef. C 70,50% H 9,37%

2) aus Aalgalle

Die spec. Drehung ist als 2% ige Lösung in absolutem Alkohol

$$[\alpha]_D = + \frac{100 \times 0,37}{1 \times 1} = + 37$$

Analyse: 0,112 : 0,2891 CO_2 u. 0,1021 H_2O

$C_{24}H_{40}O_5$ Ber. C 70,53% H 9,87%

Gef. C 70,39% H 10,19%

3) aus Anagofischgalle

Analyse: 0,1210 : 0,3124 CO_2 u. 0,1091 H_2O

$C_{24}H_{40}O_5$ Ber. C 70,53% H 9,87%

Gef. C 70,41% H 10,00%

Nach diesen Daten stimmt die Säure in allen oben beschriebenen Gallen mit Cholsäure ganz überein.

Aus der von Gallensäure befreiten Flüssigkeit der verseiften

Galle von Funafisch und Karpfen wurde nach der Methode von Salkowski (1906) der Kristall in langen Prismen erhalten, der im Wasser leicht, in absolutem Alkohol u. Äther nicht löslich ist und bei 297°C schmilzt. Er ist schwefelhaltig. Hinsichtlich seiner Eigenschaften stimmt er mit dem Taurin überein.

Aus diesen Daten geht hervor, dass die Galle von Funafisch und Karpfen Taurocholsäure enthält.

LITERATUR.

- Bensch A. (1848): A **65**, 194.
Hosokawa T. (1927): Okayama-Igakkai-Zasshi Nr. **446**, 311.
Ikoma S. (1927): J. of Bioch. **7**, 205.
Kobayashi T. (1927): Okayama-Igakkai-Zasshi Nr. **449**, 923.
Langheld (1908): Ber. **48**, 378.
Oikawa S. (1925): J. of Bioch. **5**, 63.
Pregl u. Buchtala (1911): H. **74**, 198.
Salkowski E. (1906): Prakt. der physiol. u. patholog. Chem. 3 Aufl. s. 158.
Shoda M. (1927): Okayama-Igakkai-Zasshi Nr. **447**, 443.
Strecker (1848): A. **70**, 149.
Teraoka M. (1928): J. of Bioch. **8**, 441.

ÜBER DEN EINFLUSS DER SPLANCHNICOTOMIE AUF DIE ZUCKERAUSSCHIEDUNGSSCHWELLE.

VON

SHIN-ICHI KAWASHIMA.

*(Aus der medizinischen Klinik von Prof. R. Inada,
kaiserliche Universität zu Tokyo.)*

(Eingegangen am 1. Mai 1928.)

Die Arbeiten in unserer Klinik sprechen dafür, dass die Zuckerausscheidungsschwelle bei sympathischer Erregung ansteigt. So beobachtete Nakayama (1924), dass die Schwelle für die Adrenalinglykosurie höher liegt als die der alimentären, was später von Shim (1925) bestätigt wurde. Ich fand auch (1927), dass fortgesetzte Thyreoidindarreichung schwellenerhöhend wirkt. Andererseits stellte Eda aber fest, dass parasympathische Gifte wie Pilocarpin und Acetylcholin, wenn sie in grösseren Dosen injiziert werden, sowohl den Blutzucker steigern, als auch den Schwellenwert erhöhen. Hier sei erinnert, dass Kinoshita (1926), Masamune (1926) und Sakurai (1925) übereinstimmend mitteilten, dass parasympathische Hyperglykämie nach der Splanchnicusdurchschneidung ausbleibt. Die Autoren sind der Meinung, dass parasympathische Gifte als Folge der zentralen Reizung durch den sympathischen Weg eine Blutzuckersteigerung nach sich ziehen. Nun liegt der Gedanke nahe, dass die Erhöhung des Schwellenwertes durch parasympathische Gifte ähnlich wie die Hyperglykämie dabei durch die Erregung des sympathischen Nervensystems zustande kommt. Es muss auch erwähnt werden, dass Vagusdurchschneidung auf den Schwellenwert für Adrenalinglykosurie herabsetzend wirkt (Hildebrandt 1921, Nakayama 1924 und Shim 1925). Bei solcher Sachlage ist es höchst wahrscheinlich, dass Splanchnicusdurchschneidung irgend einen Einfluss auf die Zuckerausscheidungsschwelle wie auf die Reaktion derselben von parasympathischen Giften ausübt. So habe ich auf Veranlassung und unter Leitung von Prof.

R. Inada und K. Sakaguchi diese Frage aufgenommen.

Bei meiner Untersuchung wählte ich als Versuchstier jedesmal eine Hündin von ungefähr 10 kg Körpergewicht. Dem Tiere wurde 30% Traubenzuckerlösung mit Gummischlauch in den leeren Magen eingeführt, dabei wurde der Blutzuckergehalt nach Bang'scher Methode halbstündlich bestimmt und der Harn stündlich auf Glykosurie untersucht. Der letztere wurde bei positivem Ausfall nach Pavy-Kumagawa-Suto'scher Methode quantitativ bestimmt. Die Zuckerausscheidungsschwelle wurde unter allen Kautelen bestimmt, wie sie Sakaguchi und seine Mitarbeiter (1924) dafür angaben.

Auf diese Weise habe ich zuerst den Schwellenwert für alimentäre Glykosurie bestimmt und dann den Einfluss des Acetylcholins darauf untersucht, indem ich das Gift 20-30 mg pro kg Körpergewicht subkutan injizierte. Danach führte ich beiderseitige Splanchnicotomie unterhalb des Zwerchfells aus und darauf wiederholte ich meine Untersuchung ähnlich wie vor der Operation:

Versuch I. Hund Nr. 1. 10 kg. (Belegtablelle)

Wie die Tabelle zeigt, war der Schwellenwert für die alimentäre Glykosurie in normalem Zustande des Tieres etwa 0,10%, welcher bei subkutaner Acetylcholinzufuhr von 350 mg und 230 mg auf 0,21% resp. 0,16% anstieg. Hier hat das Gift unverkennbar zugleich die alimentäre Hyperglykämie verstärkt. Nach der beiderseitigen Splanchnicusdurchschneidung fiel die alimentäre Hyperglykämie bei gleich grosser Zuckerdarreichung stärker aus, als vor der Operation. Dort wurde die Zuckerausscheidungsschwelle auch erhöht gefunden, indem sie 6 Tage nach der Operation 0,14% und nach 10 resp. 31 Tagen 0,16-0,17% betrug, Aber die Wirkung von Acetylcholin wurde durch die Operation ganz aufgehoben, so dass nach der Splanchnicotomie weder die alimentäre Blutzuckersteigerung noch die Zuckerausscheidungsschwelle durch subcutane Injektion von 220 - 250 mg Acetylcholin sichtbar beeinflusst wurden.

Versuch II. Hund Nr. 2. 10,3 kg. (Belegtablelle)

Bei diesem Tiere betrug der Schwellenwert für alimentäre Glykosurie in normalem Zustande 0,12% und bei subcutaner Zufuhr von 220 mg Acetylcholin stieg er über 0,14% an, indem die alimentäre Hyperglykämie unter den sonst gleichen Bedingungen dementsprechend verstärkt ausfiel. Nach der beiderseitigen Splanchnicusdurchschneidung stieg der Blutzuckergehalt bei gleich

Splanchnicotomie u. Zuckerausscheidungsschwelle. 339

grosser Zuckerzufuhr höher an, als vor der Operation. Hier wurde die Zuckerausscheidungsschwelle auch deutlich erhöht (0,17–0,19%) gefunden, obwohl die subkutane Injektion von 230 mg Acetylcholin darauf keinen Einfluss ausübte.

Versuch III. Hund Nr. 3. 12 kg (Belegtablelle)

Die Untersuchungsergebnisse an diesem Tiere stimmen im grossen und ganzen mit den vorangehenden überein. Der Schwellenwert für die einfache alimentäre Glykosurie war in normalem Zustande des Tieres 0,12% und bei Acetylcholinzufuhr (250 mg) 0,14%. 4 Tage nach der beiderseitigen Splanchnicotomie liess die Schwelle sich als 0,13% schätzen, welche später allmählich anstieg, so dass sie 10 Tage nach der Operation 0,15% und nach 28 Tagen 0,17% betrug. Mit der Erhöhung des Schwellenwertes hat die Verschlimmerung der Zuckerassimilation immer Schritt gehalten. Die Steigerung der alimentären Hyperglykämie und der Zuckerausscheidungsschwelle durch Acetylcholin wurde nach der Splanchnicotomie ganz vermisst.

Versuch IV. Hund Nr. 4. 12 kg (Belegtablelle)

Vor der Splanchnicotomie stieg der Schwellenwert für die alimentäre Glykosurie durch subkutane Injektion von 370 mg Acetylcholin von 0,13% bis auf 0,18% an, indem die Stärke der Hyperglykämie bei gleich grosser Zuckerzufuhr ganz parallel damit sich veränderte. Zwei Tage nach der Operation war die Zuckerassimilation noch nicht stark afficiert, während sie fünf Tage nach der Splanchnicotomie deutlich verschlimmert und die Zuckerausscheidungsschwelle auch dementsprechend erhöht (0,18%) gefunden wurde. Acetylcholin hat nach der Operation weder die Zuckerassimilation noch den Schwellenwert beeinflusst.

Versuch V. Hund Nr. 6. 8,2 kg (Belegtablelle)

Hier war der Schwellenwert für die alimentäre Glykosurie 0,12% und bei subkutaner Acetylcholinzufuhr von 300 mg stieg er auf 0,18% an. Als er 20 Tage nach der Splanchnicotomie bestimmt wurde, erwies er sich als 0,15% und blieb bei einem nach mehreren Tagen ausgeführten Acetylcholinzufuhr (270 mg) ganz unverändert.

Versuch VI. Hund Nr. 9. 10,5 kg (Belegtablelle)

Die Blutzuckerschwelle für die alimentäre Glykosurie betrug im normalen Zustande 0,13% und bei Acetylcholinzufuhr (250 mg) 0,16%. Nach der Splanchnicotomie wurde die Schwelle erhöht (0,16–0,14%) gefunden, aber die Acetylcholinwirkung darauf ganz vermisst.

Versuch VII. Hund Nr. 10. 10 kg (Belegtablelle)

Vor der Operation betrug der Schwellenwert hier 0,12% und stieg bei der Acetylcholinzufuhr (250 mg) auf 0,15% an. Am 2 Tage nach der Splanchnicotomie

durchschneidung wurde er als 0,17% geschätzt und am 14. und 18 Tage bei Acetylcholinzufuhr (250 mg) ebenso hoch gefunden. Dass die Schwelle hier 13 Tage nach der Operation wieder erniedrigt (0,13%) war, darf ich nicht ohne weiteres als zufälligen Befund unbeachtet lassen, zumal ich auch oft bei anderen Tieren, bei denen die Durchschneidung der Splanchnicusfaser nicht vollständig, sondern teilweise intakt gelassen war, 10 oder 15 Tagen nach der Operation eine Senkung der einmal erhöhten Schwelle beobachtete, was vielleicht auf die kompensatorische Wirkung der zurückgebliebenen Faser zurückzuführen ist.

Um den Einfluss der Splanchnicotomie und des Acetylcholins auf den Schwellenwert feststellen zu können, habe ich meine Untersuchungsergebnisse in folgender Tabelle übersichtlich zusammengestellt.

TABELLE I.

Versuchs Nr.	Zuckerausscheidungsschwelle %			
	normaler Zustand		nach der Splanchnicotomie	
	ohne Acetylcholin	mit Acetylcholin	ohne Acetylcholin	mit Acetylcholin
I	0,10	0,16-0,21	0,14-0,17	0,16
II	0,12	über 0,14	0,17-0,19	0,18
III	0,12	0,14	0,13-0,16	0,16
IV	0,13	0,18	0,18	0,17
V	0,12	0,18	0,15	0,15
VI	0,13	0,16	0,16	0,15
	0,12	0,15	0,17	0,17

Wie man aus den Übersicht- und Belegtabellen leicht ersieht, stimmen die Untersuchungsergebnisse meiner Versuche an 6 Hunden ganz gut überein. Am gesunden Tieren konnte ich die Angabe von Eda bestätigen, dass subcutaner Acetylcholinzufuhr auf die Zuckerausscheidungsschwelle erhöhend wirkt. Doppelseitige Splanchnicotomie wirkte bei allen Tieren auf die Schwelle erhöhend und auf die Zuckerassimilation verschlimmernd, während Acetylcholin dabei keinen Einfluss mehr ausübte. Bei meinen Versuchen fand ich, dass die Steigerung des Schwellenwertes und die Verschlimmerung der Zuckerassimilationsfähigkeit immer parallel gingen. Es sei noch erwähnt,

dass die Bestimmung des Schwellenwertes gewöhnlich mehrere Tage nach der Operation oder noch später ausgeführt wurde. Bei einigen Versuchen (Nr. 3, 19/VIII und Nr. 4, 26/VIII), wo der Schwellenwert relativ kurz nach der Splanchnicusdurchschneidung bestimmt wurde, war die Herabsetzung der Zuckeras-similation wie die Erhöhung des Schwellenwertes nicht deutlich genug. Aus meinem Befunde, dass der Einfluss von Acetylcholin nach der Splanchnicotomie ausbleibt, lässt sich vermuten, dass die Erhöhung der Zuckerausscheidungsschwelle durch parasym-pathische Gifte nicht durch den direkten Einfluss der Parasym-pathicusreizung zustande kommt, sondern infolge der zentralen Reizung des Giftes durch sympathische Erregung hervorgerufen wird, wie dies von mehreren Autoren bei parasymphathischer Hyperglykämie nachgewiesen wurde. Aber mit einem entschei-denden Schluss möchte ich vorläufig zurückhalten, weil die Schwelle nach der Splanchnicotomie ohne Acetylcholin schon erhöht war und eine plausible klare Erklärung dafür mir noch nicht möglich ist.

ZUSAMMENFASSUNG.

1. Beim gesunden Hunde wirkt Acetylcholin auf die Zuckerausscheidungsschwelle wie auf die alimentäre Hypergly-kämie erhöhend.

2. Doppelseitige Splanchnicusdurchschneidung erhöht den Schwellenwert für alimentäre Glykosurie. Hier wird die Zucker assimilierende Kraft dementsprechend verschlimmert gefunden, so dass die alimentäre Hyperglykämie bei gleich grossem Zucker-zufuhr höher zustande kommt als vor der Operation.

3. Nach der Splanchnicotomie kann man die erhöhende Wirkung des Acetylcholins auf die Zuckerausscheidungsschwelle wie auf die alimentäre Hyperglykämie gar nicht nachweisen.

LITERATUR.

- Eda (1927), Journ. Biochem. **7**, 319.
Kawashima (1927), Journ. Biochem. **7**, 361.
Kinoshita (1926), Fukuoka Ikwadaigaku Zasshi. **19**, 254.
Masamune (1926), Fukuoka Ikwadaigaku Zasshi. **19**, 137.
Nakayama (1924), Journ. Biochem. **4**, 163.
Sakaguchi, Matsuyama u. Nakayama (1924), Mitteil. d. Med. Fakult.
d. Kaiserl. Univers. zu Tokyo. **32**, 61.
Sakurai (1926), Journ. Biochem. **6**, 211.
Shim (1925), Journ. Biochem. **5**, 333.

BELEGTABLELLE.

Hund Nr.	Datum 1926	beiderseitige Splan- chnicotomie (15/VIII)	Trauben- zucker cc	Acetylcholin mg	Blutzucker mg % (Harnzucker %)						Schwellen- wert % (ungefähr)
					Vor	1/2	1	1/2	2	3	
I (10 kg)	5 VIII		24	0	80 (-)	101	104 (0,3)	110	91 spur	90 (-)	0,10
	6 VIII	vor	20	0	91 (-)	112	106 (-)	94	82 (0,35)	89 (-)	
	8 VIII	der	20	350	83 (-)	210	108 (-)	99	116 (0,25)	133 (-)	0,21
	10 VIII	Opera- tion	20	230	91 (-)	157	110 (-)	126	90 spur	85 (-)	0,16
	21 VIII	6 Tage n. d. Opera- tion	21	0	86 (-)	145	117 (-)	71	92 (0,28)	81 (0,3)	0,14
	23 VIII	8 „ „	21	250	83 (-)	160	104 (-)	105	107 (0,3)	108 (0,27)	0,16
	25 VIII	10 „ „	20	0	91 (-)	146	162 (-)	132	87 (-)	88 (0,35)	0,16
	15 IX	31 „ „	20	0	89 (-)	138	172 (-)	159	110 (0,3)	83 (-)	0,17
	22 IX	38 „ „	20	220	93 (-)	167	79 (-)	101	133 (0,3)	98 (-)	0,16
2 (103 kg)	5 VIII	vor	35	0	93 (-)	114	120 (0,35)	104	87 (-)	83 (-)	0,12
	8 VIII	der	35	0	87 (-)	118	98 (-)	92	116 (-)	83 (-)	
	16 VIII	Opera- tion	33	220	78 (-)	83	97 (-)	70	139 (-)	96 (-)	über 0,14
	25 VIII		33	0	93 (-)	98	118 (-)	122	112 (-)	91 (0,28)	0,12
	3 IX	7 Tage n. d. Opera- tion	33	0	93 (-)	172	148 (0,28)	128	116 (0,2)	93 (-)	0,17
	15 IX	20 „ „	33	0	87 (-)	150	191 (-)	149	96 (0,23)	81 (-)	0,19
	19 IX	24 „ „	33	230	91 (-)	188	120 (-)	143	164 (0,21)	134 (-)	0,18
	3 VIII	vor	27	0	94 (-)	125	120 (0,21)	74	92 spur	80 (-)	

Hund Nr.	Datum 1923	beiderseitige Splanchnicotomie (24/VIII)	Trauben- zucker g	Acetylcholin mg	Blutzucker mg % (Harnzucker %)						Schwellen- wert % (ungefähr)
					vor	30	1	1/2	2	3	
3 (12 kg)	23 VIII	vor	25	0	80 (-)	114	112 (-)	110	85 (-)	91 (-)	} 0,12
	27 VIII	„	30	0	93 (-)	118	115 (-)	110	90 (0,2)	107 (0,32)	
	8 VIII	„	27	250	90 (-)	113	135 (-)	149	122 (0,23)	100 (-)	0,14
	19 VIII	4 Tage nach	27	0	90 (-)	121	132 (0,3)	102	94 (0,2)	90 (-)	0,13
	25 VIII	10 „ „	27	0	92 (-)	131	153 (-)	124	94 (-)	81 (0,19)	0,15
	27 VIII	12 „ „	27	150	90 (-)	167	154 (-)	156	104 spur	93 (-)	0,16
	13 IX	28 „ „	28	0	86 (-)	168	170 spur	115	93 (0,3)	60 (0,25)	0,17
	22 IX	37 „ „	27	290	90 (-)	160	101 (0,5)	128	134	111 (0,2)	unter 0,16
4 (12 kg)	16 VIII	vor	33	0	92 (-)	132	115 (-)	110	102 (0,4)	96 spur	} 0,13
	10 VIII	„	32	0	88 (-)	127	118 (-)	110	98 (-)	81 (-)	
	19 VIII	„	33	370mg	92 (-)	182	160 (0,23)	107	125 (0,45)	116 spur	unter 0,18
	23 VIII	„	33	0	90 (-)	136	123 (0,45)	113	111 spur	92 (-)	unter 0,136
	26 VIII	2 Tage nach	33	0	93 (-)	142	139 (-)	100	85 (-)	84 (-)	über 0,142
	29 VIII	5 „ „	35	0	90 (-)	1700 (-)	180 spur	147	124 (-)	108 (-)	0,18
	19 IX	26 „ „	33	240	86 (-)	178	141 (0,38)	125	130 (-)	120 (-)	0,17
	15 IX	22 „ „	33	0	91 (-)	160	132 spur	116	115 spur	90 (-)	0,16
	13 VIII	vor	20	0	91 (-)	132	129 (0,25)	118	107 (-)	100 (-)	unter
	16 VIII	der	20	0	87 (-)	130	97 (0,4)	102	113 (-)	93 (-)	(etwa 0,12

Splanchnicotomie u. Zuckerausscheidungsschwelle. 345

Datum. Nr.	Datum 1926	beiderseitige Splanchnicotomie (24/VIII)	Trauben- zucker g	Acetylcholin mg	Blutzucker mg % (Harnzucker %)						Schwellen- wert % (ungefähr)
					vor	30	1	1/2	2	3	
6 (8,2 kg)	20 VIII	Operation	19	300	78 (-)	192	152 (-)	101	119 (0,3)	112 (-)	unter (etwa 0,12)
	13 IX	20 Tage n. d. Operation	20	0	93 (-)	158	139 (-)	131	105 (0,27)	83 spur	0,15
	22 IX	29 „ „ „	19	270	78 (-)	78	151 (-)	79	115 (0,3)	92 (-)	0,15
10 (10,5 kg)	24 X	vor	28	0	95 (-)	134	120 (-)	131	126 (-)	103 (-)	} 0,13
	26 X	„	30	0	97 (-)	121	133 (0,26)	120	116 (-)	98 (-)	
	27 X	„	30	250	93 (-)	163	117 (-)	93	109 spur	103 (-)	0,16
	8 XI	9 Tage nach	30	0	98 (-)	158	166 spur	163	115 (0,23)	107 spur	0,16
	9 XI	10 „	30	0	96 (-)	124	142 (-)	117	131	115 (0,16)	0,14
	15 XI	16 „	30	250	92 (-)	154	92 (0,2)	156	128 spur	111 (-)	0,15
10 (10 kg)	24 X	vor	30	0	93 (-)	120	118 (-)	117	110 spur	100 (-)	} 0,12
	26 X	„	33	0	98 (-)	129	118 (-)	110	106 (0,2)	93 (0,25)	
	27 X	„	31,5	250	98 (-)	157	135 (-)	141	129 (0,33)	118 spur	0,15
	8 XI	11 Tage nach	30	0	98 (-)	158	171 (0,2)	163	115 (0,23)	108 (-)	0,17
	10 XI	13 „	32	0	99 (-)	129	117 (-)	93	98 (-)	103 spur	0,13
	11 XI	14 „	32	250	93 (-)	180	153 (-)	131	172 (0,37)	111 (-)	} ca. 0,17
	15 XI	18 „	32	250	93 (-)	187	97 spur	124	115 (0,3)	95 spur	

ON THE SIGNIFICATION OF SOME AUXOSUBSTANCES IN THE UREASE REACTION.

By

MATSUNOSUKE KITAGAWA.

(From the Biochemical Laboratory, Kyushu Imperial University)

(Received for publication, May 21, 1928.)

M. Jacoby (1927) has made the following suggestion regarding the mechanism of the action of auxosubstances on urease, namely, that the urease becomes normally active in either of two ways; the combination of the less active urease with the auxosubstance produces a more active complex or the removal of the inhibitor from the inactive complex sets urease free in active form.

I have also held views similar to these during previous research (1926), therefore I have sought in this experiment to determine which of the two hypotheses could explain correctly the action of auxosubstance.

EXPERIMENTAL.

In this research I used the purest possible urease containing only a trace of protein as spontaneous auxosubstance prepared by the prolonged dialysis of Jackbean extract, viz. 1 mg urease preparation produced 40 cc. N/10 NH_3 at 20° for 30'.

To avoid the influence of phosphate as a buffer, I occasionally passed CO_2 -gas during reaction to adjust the pH at 7.0, which was ascertained to give no influence upon urease.

In the first place, I examined urease activity at 20° for 30' in the simple reaction system consisting of only urea and urease almost free from auxosubstance. Then the effect of an auxosubstance added to the system was examined. The results are given in Table I.

TABLE I.

urease 1 cc. (0.1 mg dry matter)
 dist. water 35 cc.
 urea 0.3 gm.

auxosubstance added	activity (N/50 NH ₃ cc.)
None added.....	0.7
glycocoll 0.3 gm.	17.0
2% fibrin suspension 2 cc.	16.6
soluble starch 0.3 gm.....	0.8
phosphate mixture 5 cc.....	9.9
KCN 0.3 gm.	20.3

As is shown in the table the most complete removal of the natural auxosubstance possible causes urease to become almost inactive, but the above three auxosubstances restore almost normal activity and phosphate has the power of partial reactivation.

I. On the combination of the auxosubstance and urease.

To test the first hypothesis, I used the urease adsorbed on Al(OH)₃, which was normally active and was similarly promoted by glycocoll as was the free urease.

TABLE II.

treatment	activity		inactivation %
	+ glycocoll	- glycocoll	
before adsorption.....	152.0	62.0	59
after adsorption.	15.2	9.5	—
above difference.....	136.8	52.5	—
(calculated activity of adsorbed urease as free).			
urease in adsorbate	127.6	28.6	77
(directly measured).			

Now I previously shook such urease adsorbate together with glycocoll, removed by washing the glycocoll not adsorbed before the addition of urea, and then made them react.

TABLE III.

urease adsorbate (suspension) 1 cc.
 dist. water 4 cc.
 urea 0.1 g.
 20° 30'

treatment	activity		inactivation %
	+glycocoll	-glycocoll	
adsorbate previously treated with glycocoll.	13.0	8.8	32
adsorbate not treated.	16.5	11.7	29

With the absence of glycocoll at the reaction, the activity of the urease previously treated with glycocoll decreased in exactly the same way as that of the urease which had not been previously treated with glycocoll.

On the other hand I examined directly the adsorption of glycocoll with such a urease adsorbate by means of the formol method, but the glycocoll concentration did not decrease after adsorption.

Second in order to examine the same relation using fibrin as one of the auxosubstances, I added insoluble, well washed fibrin in suspension to the urease solution, and after shaking, separated the adsorbate from the filtrate to make them react.

TABLE IV.

urease 1 cc.
 dist. water 20 cc.
 urea 0.25 g.
 20° 30'

treatment	activity
no auxosubstance added.	2.3
0.2 gm. glycocoll added.	14.2
1% fibrin 2 cc. added (fibrin not separated from filtrate).	14.2
" " { fibrin-urease adsorbate separated. { its filtrate.	0.5 12.8
	1.33

Though the addition of fibrin can restore the normal activity as much as glycocoll, nevertheless only 4% of such a normal active enzyme is combined with fibrin.

Therefore the two above auxosubstances can make urease almost completely active, while their supposed combinations are not observed.

II. The source of the inactivation and the reactivation mechanism.

Now to test the second hypothesis, I first examined whether some inhibitors are or are not contained in distilled water and urea used, which are the only components of the reaction system other than urease itself.

TABLE V.

urease 1 cc.
dist. water 29 cc.
urea 0.3 gm.
20°, 30'

medium used	activity
distilled water	0.1
redistillate of above dist. water	5.4
redist. water + 3 cc. condensed dist. water	0.1
dist. water added with fibrin	6.9

TABLE VI.

urease 1 cc.
dist. water 4 cc.
urea 0.25 gm.
20°, 30'

urea used	activity	
	+ glycocoll	- glycocoll
urea Kahlbaum	11.9	3.9
recrystallised urea	11.7	9.0

Even the trace of inhibitor from urea and distilled water, if combined with the pure urease preparation, is sufficient to produce almost complete inactivation.

Now I previously treated such a urea solution containing a trace of inhibitor with insoluble fibrin which was removed from solution before the reaction.

TABLE VII

urease 1 cc.
dist. water 24 cc.
urea 0.5 gm.
20°, 30'

auxosubstances added	activity
glycocoll 0.3 gm.	8.9
2% fibrin 2 cc.	8.5
none added (previously treated with fibrin)	8.4
„ „ (not treated).....	1.1

From the above result, the fibrin is known to combine itself with the inhibitor and to prevent the formation of an inactive complex between urease and an inhibitor entered accidentally into the reaction system.

III. The relation between *pH* and auxoaction.

M. Jacoby (1927) has reported the independence of *pH* and auxoaction, but in the following research I have observed some relation between them.

TABLE VIII.

urease 1 cc.
dist. water 2 cc.
 $\frac{m}{2}$ phosphat 2 cc.
urea 0.1 gm.

<i>pH</i>	activity		inactivation %
	— glycocoll	— glycocoll	
6.2	6.8	6.9	0
6.8	12.6	12.0	5
7.0	13.1	11.4	13
7.3	12.6	8.8	31
7.6	10.5	5.2	50
7.8	8.9	3.4	60

In alkaline side the inactivation without glycocoll is more distinctive and at pH 6.2 inactivation is not observed.

Summary.

The urease free from the auxosubstance never loses its activity as was formerly supposed, if the inhibitor is removed from the system in some way.

However the presence of the inhibitor from any source, namely even a mere trace of inhibitor from distilled water and urea in the case of pure urease preparation, causes a diminution of activity by the formation of an inactive complex.

If, in such cases, the auxosubstances are added, they then combine with the inhibitor in indissociable form to set free the urease in active form, or to prevent the formation of an inactive complex, and thus make urease normally active, as in the case of the reactivation of artificial zymogen of urease observed by Jacoby.

Therefore the urease activity is determined by the relative amount of auxosubstances and inhibitors in the reaction system.

REFERENCES.

- Jacoby. M. (1927). *Biochem. Z.* **181**, 194.
Kitagawa M. (1926). *Jour. agricult. chem. soc. Japan* **2**, 209.

P. S. After these studies were reported, recently I learned of the investigation about crystalline urease published by J. B. Sumner and D. B. Hand (*Jour. biol. chem.* **76**, 149, 1928), in which they gave conclusions similar to mine regarding to the action of auxosubstance of urease.

Finding my conclusions also confirmed by them, I take pleasure in acknowledging the honour due their publication.

THE EFFECT OF THE ADDITION OF PROTEIN ON THE SURFACE TENSION OF A SODIUM GLYCOCHOLATE SOLUTION.

By

RYUZO SUGINO.

*(From the Biochemical Institute, Tokyo Imperial University.
Director: Prof. Samuro Kakiuchi.)*

(Received for publication, May 25, 1928.)

I. INTRODUCTION.

The question concerning the surface tension of body fluids constitutes one of the problems of the day. According to Schmemsky (1920), Takeda (1923), Tominaga (1923) and others who studied body fluids in normal or abnormal conditions this surface tension has a profound connection with the function of body cells and gains a clinical importance as it demonstrates anomalies going on within the body. Many investigators tried to investigate the nature of substance or substances, which cause the activity of body fluids, but the result was only a divergence of opinions. It is quite certain that the surface active substance which is contained in the body fluid, for instance, glycocholic acid, is the cause of the surface activity of body fluids. It is however equally true that the surface activity of these substances is influenced by the presence of less active substances.

According to Isovesco (1911), although egg-albumin and hemoglobin reduce the surface tension of water, they become surface inactive when they are entirely pure. It is quite suggestive that in these cases the activity of protein is due to contaminated impurities. Now again, according to reports of Schemensky, and others, the surface tension of a body fluid containing protein is much influenced by the hydrogen ion concentration.

Assuming the possibility of the presence of mutual action

between some of the surface active substances and proteins in the body, and believing that the acidity of the solution may have a great influence on it, I decided to make an investigation on the surface activity of the solution containing both proteins and surface active substances and, particularly, under the different acidities of their solutions.

II. METHOD.

A. The method of determination of the surface tension.

For the choice of the method of the surface tension determination in this experiment it is necessary to take note of the following facts:

1. The surface tension of a solution containing colloidal substances will attain its maximum value only after a considerable lapse of time after the formation of new surface, because of the necessity of a certain lapse of time for the colloidal molecule to attain adsorption equilibrium on the surface. In this case the measurement of the surface tension has to be done as far as possible by a static method.

Protein solution, however, continually changes its state of aggregation, particularly in a certain stage does alteration go on very rapidly. This is equally true within the body as in the test tube. For the determination of the surface tension of protein solution in these cases, therefore, it is impossible to employ a slow static method, and it is better to use a rapid, simple and convenient dynamic method even sacrificing of absolute values. Indeed for our purpose, where the surface tension in varying conditions is compared, it is more to the point, to record rather momentary observations of surface activity than to investigate its absolute value. Of course the value obtained by the simple dynamic method must be steady and comparable with that obtained by the static method.

For the verification of the applicability of the dynamic method for my purpose I prepared a series of 1/100 mol. sodium glycocho-

late solution at pH 2 containing various amounts of caseinogen, and measured their surface tension by means of Du Noüy's tensiometer and by J. Traube's stalagmometer at the same time. The results are recorded in table I and curve 1.

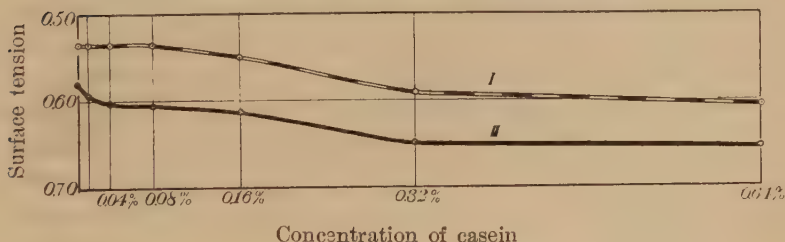
TABLE I.

Surface tension of the solution containing $\frac{1}{100}$ mol. glycocholate and various amounts of caseinogen at pH 2. by means of stalagmometer and du Noüy's Tensiometer.

No.	Endconcentration of caseinogen (%)	Surface tension by stalagmometer	Surface tension by Tensiometer
1	0	0.578	0.535
2	0.01	0.578	0.535
3	0.02	0.594	0.535
4	0.04	0.602	0.535
5	0.08	0.603	0.535
6	0.16	0.613	0.550
7	0.32	0.650	0.590
8	0.64	0.654	0.604

CURVE 1.

Surface tension of the solution containing $\frac{1}{100}$ mol. glycocholate and various amounts of caseinogen at pH=2, measured by means of stalagmometer (I) and Du Noüy's Tensiometer (II).



From this table it may be concluded that although the absolute value differs, between Du Noüy's method which is half static and Traube's Stalagmometer method which is dynamic, comparable values are always obtained. For this reason in all

of the following experiments I always used J. Traube's Stalagmometer for the measurement of surface tension.

B. Materials used for the experiments.

1. As a surface active substance sodium glycocholate of Merck was used. Although its watery solution was coloured slightly brown, I used it without any further purification as extremely surface active substances like glycocholate are not influenced much in its surface activity by the presence of small impurities.

2. As a protein of more acidic character I used Merck's caseinogen, manufactured after Hammarsten's method. As a neutral protein hemoglobin was used, and for basic protein protamin, prepared in pure state in this laboratory, was chosen. The reason why we used these proteins lies in the fact, that these proteins are much simpler and easier to purify than other proteins.

C. Measurement of the surface tension of a solution.

Care must be taken that the stalagmometer and especially its dropping end are free from grease. It must be carefully cleaned with chromic acid mixture and wiped when necessary with a clean piece of absorbent cotton. Even slight traces of grease on the dropping surface of the stalagmometer will markedly alter the size of the drops. Care should also be taken to keep the apparatus from being shaken while a measurement is taken, as thereby the drops of the liquid may be caused to fall before they attain their maximum size. For the same reason the velocity of the flow of the liquid must be regulated so that the drops are not formed too rapidly; and although the rate of dropping may be varied, up to a certain point, without affecting the size of the drops, it should not be allowed to increase above a maximum of 20 drops per minute. If the natural rate of dropping is greater, the rubber tubing which is attached to the upper end of the apparatus must be pinched in such a way as to

retard the velocity of the flow of the liquid. Determinations ought to be carried out at constant temperature.

At first the rate of dropping for distilled water was determined and was found to be 28.4 drops at 25°C. After this the apparatus was well dried, measurement with the solution to be examined was repeated 5 times and an average was taken. In all my experiments no more difference than 0.2–0.3 of a drop was found. Then the relative density of the examined solution towards distilled water at 25° was measured. The relative surface tension is given by the equation

$$\sigma = \frac{N^w}{N} D$$

σ - surface tension of examined liquid, N^w number of drops of distilled water, N number of drops of examined liquid, D its density.

*D. Determination of the H- ion concentration
in a solution.*

For the determination of the hydrogen-ion concentration the quinhydrone electrode was used so long as the pH remained less than 7, while in cases of alkaline solutions with pH higher than 7, the gas cell method was followed. The quinhydrone was prepared by Billmann's method, and before using it was washed twice in the examined liquid.

III. SURFACE ACTIVITY OF SODIUM GLYCOCHOLATE
AT VARIOUS pH VALUES.

The 1/100 mol. or 1/1000 mol. sodium glycocholate solution at various pH values was obtained by the addition of suitable quantities of HCl or NaOH in increased strength. The pH-value and the surface tension of these solution were then determined. As the surface activity of the glycocholate solution is much influenced by the presence of NaCl, I availed myself of the formula proposed by Doumer (1921) for the correction of my experimental datas:

$$y = \frac{a}{1-q} \{ 1 - q^{1x(' + k\sqrt{z})} \}$$

x ..gm. per liter of sodium glycocholate

y ..diminishing of the surface tension

z ..gm. per liter of sodium chloride

$a=30$
 $q=0.859$
 $k=1.9$

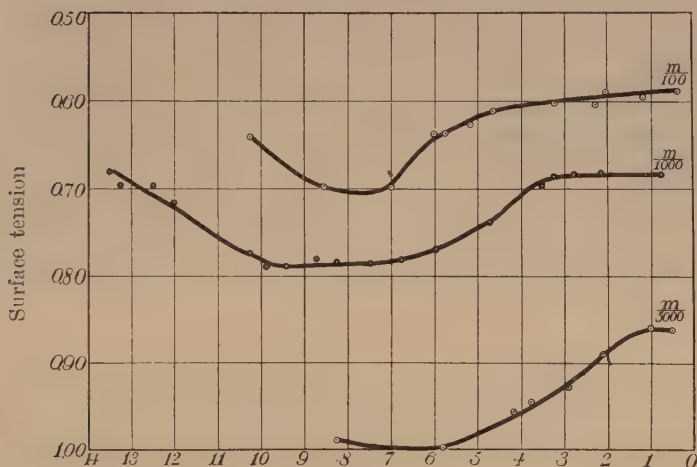
The results are shown in table II and curve 2.

TABLE II.
Surface tension of sodium glycocholate solution of three different strengths at various pH values.

$\frac{1}{100}$ mol. glycocholate		$\frac{1}{1000}$ mol. glycocholate		$\frac{1}{5000}$ mol. glycocholate	
pH	surface tension	pH	surface tension	pH	surface tension
0.48	0.589	0.81	0.684	0.52	0.861
1.20	0.592	2.19	0.684	1.03	0.860
2.04	0.590	2.81	0.683	2.11	0.883
2.32	0.603	3.30	0.685	2.95	0.927
3.25	0.601	3.58	0.697	3.79	0.945
4.71	0.610	4.78	0.738	4.19	0.955
5.19	0.627	6.00	0.770	5.83	0.998
5.78	0.635	6.80	0.781	8.26	0.990
6.03	0.637	7.50	0.785		
7.01	0.699	8.31	0.784		
8.57	0.697	8.72	0.780		
10.26	0.640	9.45	0.788		
		9.90	0.789		
		10.27	0.773		
		10.70	0.748		
		12.02	0.715		
		12.50	0.697		
		13.30	0.699		
		13.48	0.680		

CURVE 2.

Surface tension of glycocholate solution of three different strengths at various pH values.



From this table and figure it may be seen that surface activity increases with the diminution of the pH value. In 1/1000 mol. solution the activity becomes maximum at $\text{pH}=3.5$. This is perhaps on account of the fact that 1/1000 mol glycocholate solution set free enough of glycocholic acid at this pH to give monomolecular layer on the surface. With a more concentrated solution activity becomes maximum at a higher value of Ph. On the other hand if the pH of a solution increases beyond a certain value, its surface activity also increases. As in this case the viscosity of the solution also increases the use of water for the hydration of the solute probably let the solution behave itself as if it were more concentrated.

IV. THE SURFACE TENSION OF CASEINOGEN SOLUTION.

A slightly alkaline solution of caseinogen is made at first by the addition of a fixed quantity of NaOH to a fixed quantity

of caseinogen solution, and to this are added suitable amounts of HCl or NaOH for obtaining various pH values of the solution. In these solutions both surface tension and hydrogen-ion concentration are measured. The results are given in table III curve 3.

Caseinogen differs from other proteins mentioned below by its stronger surface activity and, moreover, by its greater susceptibility to the variation of pH, precipitates are formed entirely at its isoelectric point.

The concentrations of caseinogen were 0.5%, 0.075%, and 0.01%. As is clear from the table and figure the more concentrated the solution, the more surface active it is except

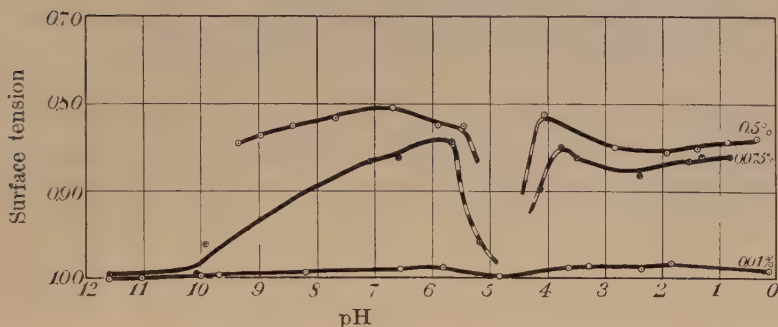
TABLE III.

Surface tension of caseinogen solution of different concentration at various pH values.

0.5% caseinogen solution		0.075% caseinogen solution		0.01% caseinogen solution	
pH	surface tension	pH	surface tension	pH	surface tension
0.30	0.839	0.86	0.860	0.31	0.990
0.86	0.842	1.37	0.861	1.82	0.984
1.42	0.849	1.53	0.865	2.38	0.989
1.95	0.854	2.42	0.882	3.31	0.984
2.84	0.848	3.50	0.861	3.64	0.987
4.08	0.812	3.76	0.848	4.85	0.997
5.48	0.827	4.13	0.898	5.81	0.988
5.91	0.823	5.17	0.987	6.54	0.990
6.69	0.809	5.66	0.842	8.20	0.995
7.68	0.815	6.57	0.860	9.72	0.998
8.42	0.827	7.09	0.865	10.00	0.998
8.97	0.836	9.92	0.960	11.02	1.00
9.34	0.845	10.08	0.998	11.60	1.00
		11.60	0.998		

CURVE 3.

Surface tension of caseinogen solution of different concentration
at various pH values.



when near its isoelectric point, where the interpretation becomes extremely difficult as some caseinogen is excluded from the solution.

The effect of the concentration of caseinogen on the surface tension of the solution at definite acidities was then studied by varying the concentration of the caseinogen, the acidity of the solution being chosen as $\text{pH}=2$ and $\text{pH}=6$, avoiding the reaction near the isoelectric point.

The relation of the surface activity of the solution to the concentration of protein contained in them, is shown in table IV and curve 5 and 6.

TABLE IV.

Surface tension of caseinogen at $\text{pH}=2$ and $\text{pH}=6$.

End concentration of caseinogen %	0.64	0.32	0.16	0.08	0.04	0.02	0.01
Surface tension at $\text{pH}=2$	0.849	0.848	0.855	0.870	0.884	0.923	0.988
Surface tension at $\text{pH}=6$	0.786	0.802	0.842	0.850	0.882	0.950	0.977

The table and figure indicate that the surface activity increases together with the concentration of the casein. The rate

of increase is, however, more pronounced in low concentrations than in high ones.

V. SURFACE TENSION OF THE SOLUTION CONTAINING SODIUM GLYCOCHOLATE AND CASEINOGEN.

In order to have an idea about the surface tension of solutions containing both glycocholate and caseinogen, I prepared the following mixtures of divergent proportionality of both these constituents.

No.	concentration of		ratio of glycocholate: caseinogen
	glycocholate	caseinogen	
1	1/100	0.01	1
2	1/250	0.250	1/6.25
3	1/500	0.05	1/25
4	1/750	0.075	1/56.25
5	1/1000	0.01	1.100
6	1/2500	0.25	1/625
7	1/5000	0.50	1/2500

Mixture No. 1. contains the smallest quantity of caseinogen and the largest concentration of glycocholate, while mixture No. 7, contains, inversely, the largest quantity of caseinogen and the least concentration of glycocholate. Between those two extremes various degrees of composition were prepared. With such solutions of varying mixture and of various pH values, the surface tension of each solution was determined. The results are shown in table V and curve 4.

From the table and curve it can be seen that:

1. When the concentration of glycocholate is large and that of protein is small, the change of surface tension is less influenced by the presence of protein and is modified mainly by the amount of glycocholate.

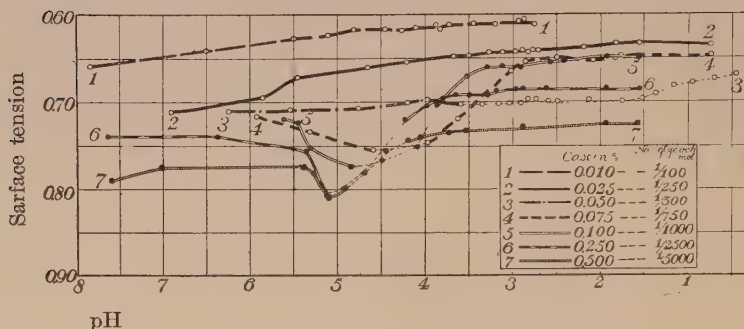
TABLE V.

Surface tension of the solution containing various amounts of glycocholate and caseinogen.

caseinogen 0.01%, glycoch. $\frac{1}{100}$ mol.		caseinogen 0.025%, glycoch. $\frac{1}{250}$ mol.		caseinogen 0.05%, glycoch. $\frac{1}{500}$ mol.		caseinogen 0.075%, glycoch. $\frac{1}{750}$ mol.		caseinogen 0.1%, glycoch. $\frac{1}{1000}$ mol.		caseinogen 0.1%, glycoch. $\frac{1}{2500}$ mol.		caseinogen 0.5%, glycoch. $\frac{1}{5000}$ mol.	
pH	surface tension	pH	surface tension	pH	surface tension	pH	surface tension	pH	surface tension	pH	surface tension	pH	surface tension
2.75	.610	0.74	.633	0.48	.668	0.74	.648	1.57	.651	1.59	.683	1.61	.723
2.90	.606	1.55	.632	0.70	.671	1.77	.646	1.90	.650	1.94	.683	1.97	.723
3.17	.610	1.82	.633	0.95	.677	2.19	.654	2.44	.654	2.63	.683	2.89	.725
3.39	.605	2.19	.638	1.16	.680	2.50	.649	2.59	.653	2.99	.683	3.55	.728
3.46	.607	2.70	.639	1.38	.688	2.84	.655	2.89	.658	3.32	.688	3.76	.730
3.74	.609	2.79	.642	1.52	.692	3.01	.663	3.14	.661	3.51	.693	4.06	.736
3.79	.612	2.90	.642	1.76	.694	3.63	.721	3.34	.660	3.67	.693	4.20	.744
3.90	.611	2.99	.642	2.13	.697	3.98	.745	3.53	.669	3.84	.698	4.42	.752
4.12	.614	3.12	.644	2.49	.693	4.60	.753	3.86	.702	3.98	.707	4.92	.794
4.27	.615	3.27	.643	2.64	.700	5.31	.736	4.07	.752	4.24	.719	5.11	.805
4.43	.613	3.49	.647	2.69	.692	5.92	.716	4.50	.765	4.69	.780	5.26	.778
4.83	.617	3.67	.647	2.83	.696			4.85	.773	5.12	.809	5.37	.770
5.14	.623	3.96	.647	2.90	.701			5.33	.751	5.29	.768	7.02	.773
5.50	.626	4.23	.652	3.17	.701			5.45	.730	5.37	.753	7.59	.790
6.50	.640	4.66	.661	3.35	.705			5.64	.718	6.04	.740		
7.84	.650	5.46	.669	3.59	.700					7.68	.742		
		5.85	.695	3.93	.693								
		6.92	.709	4.21	.696								
				4.76	.706								
				5.56	.706								
				6.26	.708								

CURVE 4.

Surface activity of the solution containing various concentration of sodium glycocholate and casein.



2. In a solution with much protein, the value of the surface tension varies very much in connection with changes of pH and particularly its variations around the isoelectric point are considerable. This I think is due to the circumstance that at the isoelectric point caseinogen begins to form a precipitate.

3. However in case of mixture No. 3, where 0.05% of caseinogen and 1/500 mol. glycocholate are used, the surface tension remains almost the same with variations of pH, in spite of the formation of a precipitate at certain values of pH. This deserves to be noted.

4. The limiting value of pH, where caseinogen begins to precipitate from its solution with glycocholate, moves more to the acidic side than the isoelectric point of pure caseinogen, the more glycocholate is present in the solution. It suggests to us that the precipitate formed is a compound of caseinogen, which is more acidic than the original caseinogen.

From the above results it may be said that when the quantity of caseinogen is small in comparison with the amount of glycocholate, the surface tension of the solution changes according to the pH, just as the surface tension of sodium glycocholate changes according to the pH, both variations being alike. On

the contrary, when the amount of caseinogen within a solution is abundant and the quantity of glycocholate is small the surface tension of the solution varies just as in a caseinogen solution.

At a certain ratio in the concentration of both solutes the surface tension of the solution exhibits a change in the nature of type, and this relation seems to be closely connected with the acidity. To clear up the meaning of this relation it seemed necessary to examine the change of surface tension in a solution containing a definite quantity of glycocholate when mixed with an increasing amount of caseinogen. It is also evident from the result shown in curve V, that with caseinogen, the pH of the solution must either be taken less than 3 and more than 5.5, Accordingly I prepared the glycocholate solutions with pH=2 and pH=6, in two concentrations of 1/100 and 1/1000 mol., varied the amount of added caseinogen and determined the pH and the surface tension of each of these solutions.

VI. THE EFFECT OF THE ADDITION OF CASEINOGEN ON THE SURFACE TENSION OF 1/100 MOL. AND 1/1000 MOL. SODIUM GLYCOCHOLATE AT pH=2 AND pH=6.

To a series of 1/100 mol. and 1/1000 mol. solutions of sodium glycocholate at pH=2 and pH=6, was added various amounts of caseinogen and the surface activity of these solutions was determined. The results with pH=2 are given in table VI and curve 5.

As can be seen from the table and the figure, in the solution containing 1/100 mol. glycocholate the addition of increasing quantities of the caseinogen caused the decrease of the surface activity of the solution, until the concentration of the caseinogen attained 0.4%, where a definite surface tension is established and where a further increase in the concentration of caseinogen could not lower the surface tension. On the contrary, with 1/1000 mol. glycocholate solution the addition of caseinogen in increasing quantities increases the surface activity of the solution until

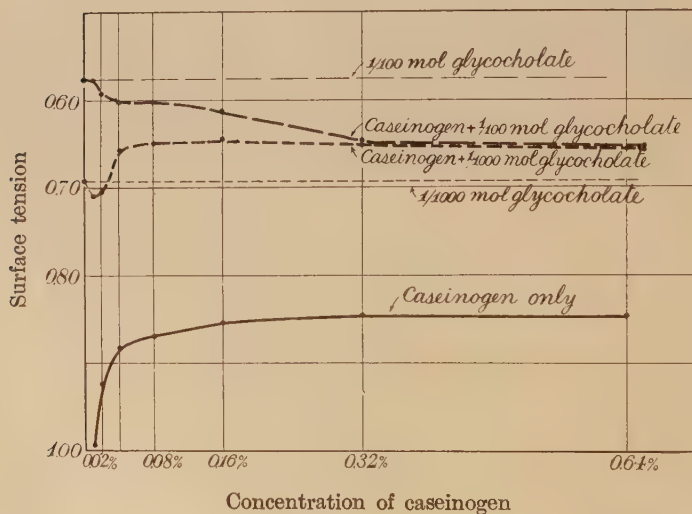
TABLE VI.

Surface tension of solution containing $\frac{1}{100}$ mol. and $\frac{1}{1000}$ mol. glycocholate and various amount of caseinogen at pH=2.

End concentration of caseinogen (%)	Surface tension of the solution		
	$\frac{1}{100}$ mol. glycocholate + caseinogen	$\frac{1}{1000}$ mol. glycocholate + caseinogen	caseinogen only
0	0.578	0.694	1.000
0.01	0.578	0.710	0.988
0.02	0.594	0.707	0.923
0.04	0.602	0.658	0.884
0.08	0.603	0.650	0.870
0.16	0.613	0.648	0.855
0.32	0.650	0.652	0.848
0.64	0.654	0.659	0.849

CURVE 5.

Surface tension of solution containing $\frac{1}{100}$ mol. and $\frac{1}{1000}$ mol. glycocholate and various amount of caseinogen at pH=2.



the concentration became about 0.04%. At this point the surface tension acquired a certain definite value, which could not be influenced with the further addition of casein. Curiously enough this constant value of surface tension perfectly agrees with that of 1/100 mol. glycocholate solution. And further, while in 1/100 mol. glycocholate concentration the constancy of surface tension is reached at 0.4% of caseinogen, the same constancy was observed in the case of 1/1000 mol. solution when there was 0.04% of caseinogen, showing thus that there is a definite stoichiometrical relation between glycocholate and caseinogen. It is quite reasonable to suppose that at the reaction $\text{pH}=2$, where caseinogen behaves as a base, there exists a definite chemical compound between glycocholic acid and protein, the surface activity of which is definite at a definite pH value whenever its amount in the solution is enough to form the necessary unimolecular layer.

The result obtained at $\text{pH}=6$, where casein behaves as an acid, is shown in table VII and curve 6.

Here both caseinogen and glycocholate exert their surface activities independently and the surface tension of the solution is the result of the activities of its constituents. We can see in the curve that in 1/100 mol. glycocholate solution, where the activity is in itself already quite great the presence of protein does not change much the activity of the solution, while in 1/1000 mol. glycocholate the vacant surface layer yet unoccupied by the glycocholic acid molecule may be filled by molecules of added protein. Therefore, the more concentrated the glycocholate, the lower the surface tension of the solution.

That the surface activity of 1/1000 mol. solution of sodium glycocholate at $\text{pH}=2$ is increased by the addition of caseinogen can be interpreted by the formation of protein glycocholate, the molecules of which orient themselves with the glycocholic acid part in the direction of air, while the hydrophilic protein part remains within the water layer. This proteinous basal part can cover quite easily the surface of the solution and helps the

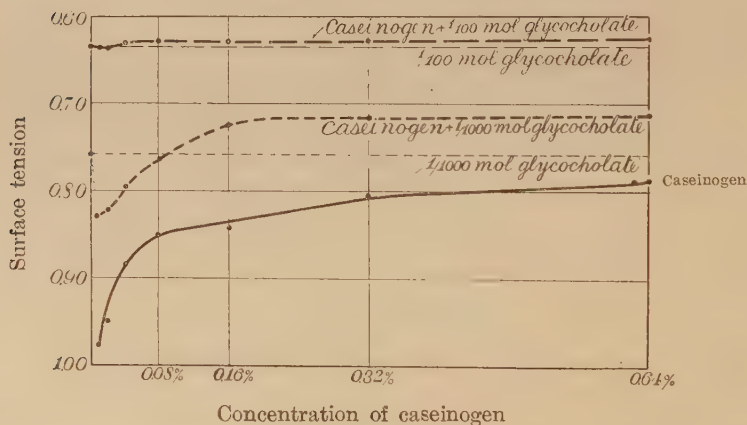
TABLE VII.

Surface tension of solution containing $\frac{1}{100}$ mol. and $\frac{1}{1000}$ mol. glycocholate and various amounts of caseinogen at pH=6.

End concentration of caseinogen (%)	Surface tension of the solution		
	$\frac{1}{100}$ mol. glycocholate + caseinogen	$\frac{1}{1000}$ mol. glycocholate + caseinogen	caseinogen only
0	0.637	0.757	1.000
0.01	0.635	0.829	0.977
0.02	0.634	0.823	0.950
0.04	0.628	0.797	0.882
0.08	0.627	0.765	0.850
0.16	0.627	0.728	0.842
0.32	0.626	0.717	0.802
0.64	0.626	0.716	0.786

CURVE 6.

Surface tension of solution containing $\frac{1}{100}$ mol. and $\frac{1}{1000}$ mol. glycocholate and various amounts of caseinogen at pH=6.



glycocholic apical part in reducing surface tension when the latter is quantitatively yet insufficient to reduce the surface tension of the solution fully.

On the other hand it is also conceivable that the surface activity of 1/100 mol. glycocholate solution at $\text{pH}=6$ is reduced by the addition of protein, as the latter depletes the free glycocholic acid for the formation of protein glycocholate, the surface activity of which is much lower than free glycocholic acid. So long as free glycocholic acid remains in the solution, the surface activity is higher than that of the resulting protein glycocholate solution. When once the surface of the solution is covered with this protein glycocholate the further increase of the amount of this compound in the solution does not increase the surface activity of the solution. Hence 1/100 and 1/1000 mol. glycocholate solution yield the same value.

VII. THE SURFACE TENSION OF THE SOLUTION CONTAINING HEMOGLOBIN AND GLYCOCHOLATE.

In this experiment hemoglobin was used in place of caseinogen in the foregoing experiment and exactly the same relation was obtained.

Hemoglobin solution itself is also somewhat surface active and therefore with an increase in the concentration of hemoglobin the surface activity of the solutions increases also.

To each series of 1/100 mol. and 1/1000 mol. glycocholate solution at $\text{pH}=3$, where hemoglobin behaves distinctly as a base were added various amounts of hemoglobin, and their surface activity was followed. The result is shown in table VIII and curve 7.

In the case of 1/100 mol. solution of glycocholate, the increasing addition of hemoglobin gradually causes the decrease of surface activity. While the velocity of decrease is large initially, it slows down very much, when the addition of protein becomes great, surface tension being 0.634 at 1/4% Hb, and 0.639 at 1/2% of Hb. From the curve it likely reached its constant value of the surface tension when the concentration of hemoglobin was getting a little over 1/2%. On the other hand in the case of 1/1000 mol. glycocholate solution the addition of Hb.

TABLE VIII.

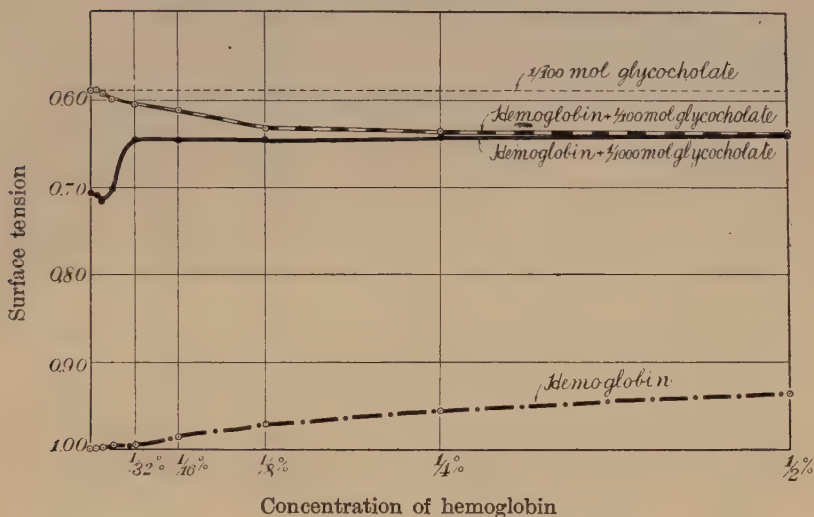
Surface tension of solution containing $\frac{1}{100}$ mol. and $\frac{1}{1000}$ mol. glycocholate and various amounts of hemoglobin at pH=3.

End concentration of hemoglobin (%)	Surface tension of the solution		
	$\frac{1}{100}$ mol. glycocho- late + Hemoglobin	$\frac{1}{100}$ mol. glycocho- late + Hemoglobin	Hemoglobin only
0	0.583	0.706	1.000
$\frac{1}{256}$	0.588	0.707	1.000
$\frac{1}{128}$	0.593	0.714	0.998
$\frac{1}{64}$	0.599	0.702	0.996
$\frac{1}{32}$	0.605	0.645	0.995
$\frac{1}{16}$	0.612	0.647	0.985
$\frac{1}{8}$	0.632	0.645	0.970
$\frac{1}{4}$	0.637	0.642	0.955
$\frac{1}{2}$	0.639	0.640	0.934

in increasing amounts results in a great increase in surface activity. The surface activity, however, becomes constant when the content of Hb added amounts to about 1/16% and does not change more on the further addition of Hb. It is noteworthy that the same constant surface tension is observed here as in case of 1/100 mol. glycocholate solution. Further more, that the same maximum value is obtained with a ten

CURVE 7.

Surface tension of solutions containing $\frac{1}{100}$ mol. and $\frac{1}{1000}$ mol. glycocholate and various amounts of hemoglobin at pH=3.



times weaker concentration of hemoglobin in 1/1000 mol. glycocholate solution than in 1/100 mol. glycocholate solution indicates clearly the existence of a stoichiometric combination between glycocholic acid and hemoglobin in the solution at pH=3.

The experiment with the solution at pH=12, where hemoglobin distinctly exists as an acid, is recorded in table IX and curve 8. The nature of the curves here is quite the same as those in the case of caseinogen (Fig. 6) and denies the existence of a chemical compound between glycocholic acid and protein at this acidity, what is quite natural. In these experiments it is shown, that hemoglobin, like caseinogen, combines with glycocholic acid on the acid side of its isoelectric point and so changes the surface activity of the latter, the mode of interference being different according to the condition. On the basic side they do not enter into any chemical combination.

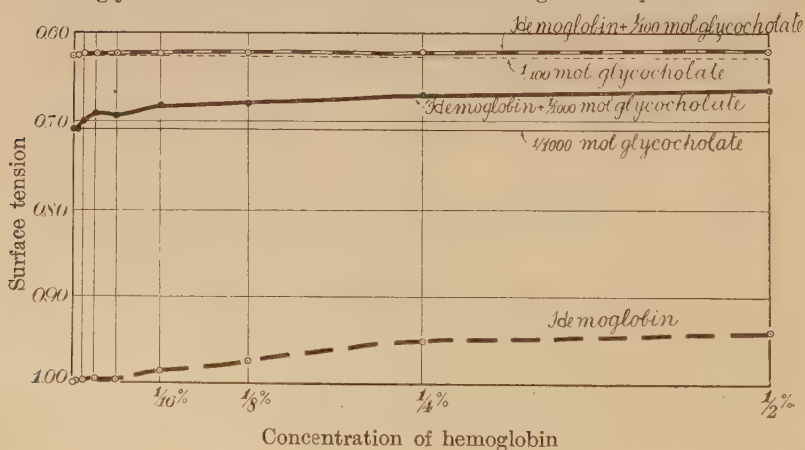
TABLE IX.

Surface tension of solutions containing $\frac{1}{100}$ mol. and $\frac{1}{1000}$ mol. glycocholate and various amounts of hemoglobin at pH=12.

End concentration of hemoglobin (%)	Surface tension of the solution		
	$\frac{1}{100}$ mol. glycocholate + Hemoglobin	$\frac{1}{1000}$ mol. glycocholate + Hemoglobin	Hemoglobin only
0	0.624	0.709	1.000
$\frac{1}{256}$	0.624	0.710	0.999
$\frac{1}{128}$	0.623	0.700	0.999
$\frac{1}{64}$	0.623	0.691	0.995
$\frac{1}{32}$	0.623	0.695	0.996
$\frac{1}{16}$	0.623	0.683	0.987
$\frac{1}{8}$	0.620	0.679	0.974
$\frac{1}{4}$	0.620	0.670	0.950
$\frac{1}{2}$	0.621	0.664	0.938

CURVE 8.

Surface tension of solutions containing $\frac{1}{100}$ mol. and $\frac{1}{1000}$ mol. glycocholate and various amounts of hemoglobin at pH=12.



VIII. THE SURFACE TENSION OF THE SOLUTION CONTAINING
PROTAMINE AND GLYCOCHOLATE.

It is shown above that caseinogen and hemoglobin have an influence on the surface activity of the glycocholate solution because of their combination with the latter substance. As, however, both caseinogen and hemoglobin themselves are shown to be surface active, I sought for a protein, which is not surface active itself, to find whether the same relationship with that protein and glycocholic acid exists as I have got above. In this experiment, therefore, salmin was used and exactly the same experimental method was followed as in foregoing sections.

Protamin used in this experiment was kindly given by Prof. S. Kakiuchi, the head of our institute, and exhibited no surface activity, as is shown in table X and curve 9.

When this protamin was added in an increasing amount to the 1/100 mol. and 1/1000 mol. glycocholate solutions, the influence of the addition of protamin on the surface activity of glycocholate solution was observed in exactly the same manner as was seen with caseinogen and hemoglobin.

The results obtained with 1/100 mol. and 1/1000 mol. glycocholate at pH=6 are given in table X and curve 9.

As is clear from the table and curve, the surface activity of 1/1000 mol. glycocholate solution at pH=6 increased with the increasing addition of protamin, to attain its maximum value at 0.05 % of protamine, and the further addition of protamin gave no increase in activity.

In the case of 1/100 mol. solution of glycocholate of the same pH, the addition of protamin induced no increase in the surface activity of the solution. This is probably due to the fact, that the surface tension of 1/100 mol. glycocholate solution at this pH had itself just the same value as the surface tension exhibited by the protamin glycocholate solution, the addition of protamin producing thus the same surface tension as the original solution.

TABLE X.

Surface tension of a solution containing protamin and glycocholate at pH=6.

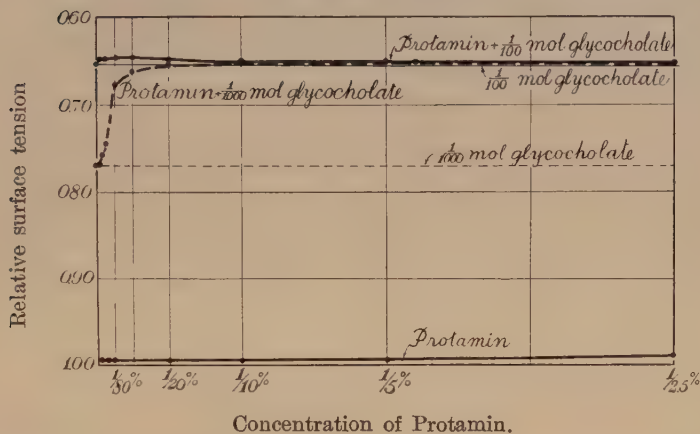
Endconcentration of protamin (%)	Surface tension of the solution		
	$\frac{1}{100}$ mol. glycocho- late + protamin	$\frac{1}{1000}$ mol. glycocho- late + protamin	Protamin only
0	0.654	0.770	1.000
$\frac{1}{1280}$	0.654	0.765	0.995
$\frac{1}{640}$	0.657	0.768	0.995
$\frac{1}{320}$	0.659	0.758	0.995
$\frac{1}{160}$	0.658	0.744	0.995
$\frac{1}{80}$	0.659	0.678	0.995
$\frac{1}{40}$	0.655	0.662	0.995
$\frac{1}{20}$	0.656	0.654	0.995
$\frac{1}{10}$	0.655	0.654	0.995
$\frac{1}{5}$	0.654	0.654	0.994
$\frac{1}{2.5}$	0.650	0.653	0.990

The results obtained by the experiment at pH=13.3, where protamin exists distinctly as an acid is given in table XI. and curve 10.

As is clear from the table and curve, in both of $\frac{1}{100}$ mol. and $\frac{1}{1000}$ mol. glycocholate solutions the addition of protamine does neither decrease nor increase the surface activity. It is thus clearly demonstrated that if to glycocholate at pH=13.3 is added a surface inactive protamin, the surface tension of the glycocholate solution experiences no change, while in the solution

CURVE 9.

Surface tension of a solution containing protamin and glycocholate at pH 6.



at pH=6 the addition of protamin causes a great change in the glycocholate solution due to the combination of these two substances.

IX. THE SURFACE ACTIVITY OF A SOLUTION CONTAINING
1/1000 MOL. GLYCOCHOLATE AND 0.1 % PROTAMINE
AT VARIOUS H-ION CONCENTRATIONS.

In previous chapters I found that in the reaction of the solution on the acid side of the isoelectric point of protein glycocholic acid and protein enter into a chemical combination and produce a definite compound, which has aspecific surface activity, while on the basic side of the isoelectric point the substances do not form any definite chemical compound and the surfaceactivity in this case represents only an additive character differing according to the conditions.

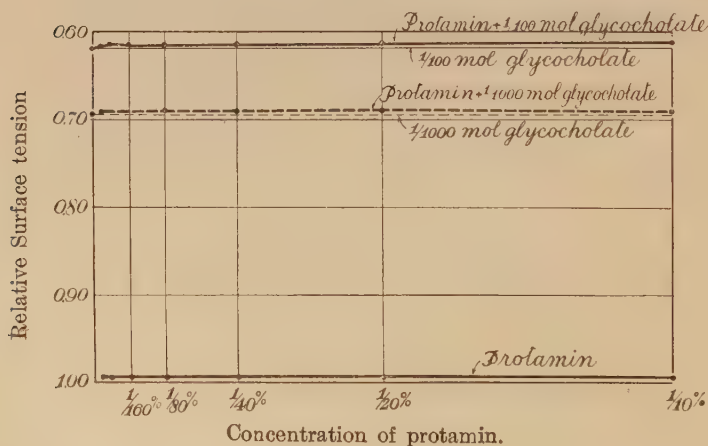
From this it follows that when the reaction of a solution containing a protein-glycocholate compound is more alkaline than

TABLE XI.
Surface tension of the solution containing protamin and
glycocholate at pH=13.3

Endconcentration of protamin (%)	Surface tension of the solution		
	$\frac{1}{100}$ mol. glycocho- late + protamin	$\frac{1}{1000}$ mol. glycocho- late + protamin	protamin only
0	0.621	0.695	1.000
$\frac{1}{1280}$	0.621	0.695	0.997
$\frac{1}{640}$	0.621	0.695	0.997
$\frac{1}{320}$	0.620	0.695	0.995
$\frac{1}{160}$	0.620	0.695	0.995
$\frac{1}{80}$	0.615	0.695	0.995
$\frac{1}{40}$	0.615	0.695	0.997
$\frac{1}{20}$	0.612	0.695	0.997
$\frac{1}{10}$	0.610	0.694	0.995

CURVE 10.

Surface tension of the solution containing protamin and
glycocholate at pH 13.3



a certain value the compound is completely dissociated, while, when the pH of the solution is lower than this certain value, the combination occurs, which will be complete at a certain acidity. In the Intermediate position of acidity the quantity of glycocholic acid and protein entering into chemical combination varies,

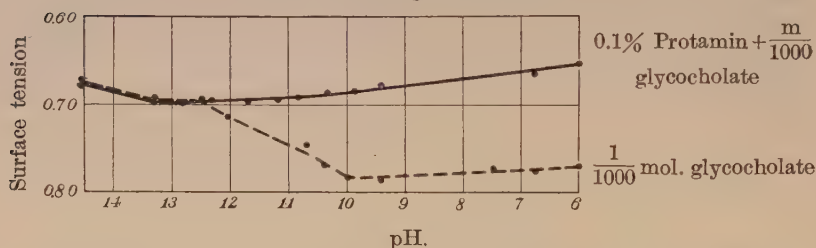
TABLE XII.

Surface tension of 0.1% Protamin and $\frac{1}{1000}$ mol. glycocholate at various pH values.

0.1% protamin + $\frac{1}{1000}$ mol. glycocholate		$\frac{1}{1000}$ mol. glycocholate alone	
pH	surface tension	pH	surface tension
6.00	0.654	6.00	0.770
6.75	0.667	6.80	0.780
7.52	0.655	7.54	0.770
9.47	0.682	9.29	0.791
9.92	0.685	10.05	0.783
10.35	0.688	10.40	0.768
10.84	0.688	10.72	0.745
11.18	0.692	11.07	0.742
11.70	0.698	11.74	0.732
12.15	0.695	12.08	0.714
12.32	0.697	12.30	0.713
12.54	0.699	12.52	0.702
12.83	0.700	12.80	0.698
13.30	0.694	13.28	0.695
14.52	0.680	14.48	0.681

CURVE 11.

Surface tension of 0.1% protamin and $\frac{1}{1000}$ mol. glycocholate
at various pH values.



depending on the variation of the pH with a consequent variation in the surface activity.

To follow the relation of this interdependence between the pH value of the solution and the combination grade of protamin-glycocholate, I have determined the surface tension of the solution containing $\frac{1}{1000}$ mol. glycocholate and 0.1 % protamin at various pH values. This divergent value of the pH of the solution was made by the addition of various amount of NaOH and HCl to the solution, and was measured either by quinhydrone electrode or by gas electrode.

The results are shown in table XII and curve 11.

As it is seen from this curve protamine and glycocholate molecules are entirely in a dissociated state at Ph=12.5 without forming any chemical compound, while they exist fully combined at Ph=9.

At intermediate positions of pH the degree of combination gradually varies with the change in pH value.

1) The degree of combination of glycocholic acid and protamine accompanying the variations of pH, may be examined from the following point of view; namely: at pH=12.5 or in a more alkaline reaction, the surface activity of the solution, consisting of a mixture of glycocholic acid and protamine, is the same as the surface activity of pure glycocholate solution and protamin has no surface activity. The combination between the two substances in these regions stands at zero.

2) At pH=9.5 or in a more acidic reaction the difference between the surface activity of protamine-glycocholate mixture solution and that of a pure glycocholate solution is already at its maximum value (σ_m). Protamine and glycocholic acid are here completely combined.

3) Then the difference between the surface tension (σ_m) of the protamine glycocholate solution at any intermediate pH value and the surface tension (σ_g) of pure glycocholate solution can

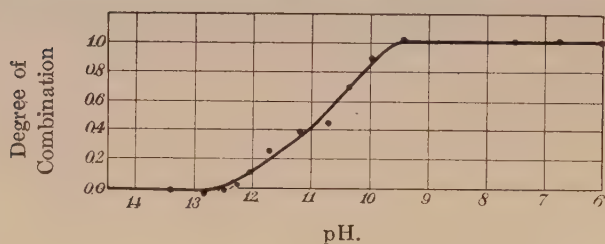
TABLE XIII.

Surface activity of 0.1% protamin and $\frac{1}{1000}$ mol. glycocholate at various pH values.

pH	$1-\sigma_m$	$1-\sigma_g$	$\frac{\text{Activity of mixture}}{\text{Activity of glycocholate}}$	Degree of combination
6.00	0.346	0.230	1.50	1.00
6.75	0.333	0.220	1.51	1.02
7.52	0.345	0.230	1.50	1.0
9.47	0.318	0.209	1.52	1.04
9.92	0.315	0.217	1.45	0.90
10.35	0.312	0.232	1.34	0.68
10.84	0.317	0.255	1.22	0.44
11.18	0.308	0.258	1.19	0.38
11.70	0.302	0.268	1.13	0.26
12.15	0.305	0.286	1.06	0.01
12.32	0.303	0.287	1.05	0.01
12.54	0.301	0.298	1.01	0.00
12.83	0.300	0.302	0.995	0.00
13.30	0.306	0.305	1.00	0.00
14.52	0.320	0.319	1.00	0.00

CURVE 12.

The combination degree of protamin glycocholate at various pH.



be taken as an indication of the combination of glycocholate acid and protamin, a value of the combination degree being given by the following expression

$$\frac{1 - \sigma_m}{1 - \sigma_g}$$

If we represent the degree of combination in ordinate and trace their value at several points of pH in abscissae, the curve 12 may be constructed. (See table XIII and curve 12.)

Although this curve represents only the stability curve of protamin glycocholate for varying acidities of the solution, it might give some measure of the basity of the protamin as well. It may be reasonable to suppose that at pH 12.5 the dissociation of protamin as a base is entirely inhibited, while at pH 9.5 the protein can exist fully as cation. The curve therefore may be taken as a dissociation curve of protamin as an base. The pOH value of this curve then may represent pK_b of protamin, giving 10^{-8.3} for K_b.

X. SUMMARY.

1. The surface tension of a glycocholate solution is or is not influenced by the addition of a protein, according to the hydrogenion concentration of the solution.

2. Only at a H-ion concentration of the solution where a protein exists as cation does the presence of the protein influence the surface activity of the glycocholate solution. The change

of the surface activity is caused by the combination of protein with glycocholic acid.

3. The combination of protein with glycocholic acid shows a stoichiometric relation.

4. In this work an explanation is given for the phenomenon that the addition of protein to a very weak solution of glycocholate increases the surface activity of the solution, while in case of a more concentrated glycocholate solution the diminution of the surface activity is observed.

The author expresses here his heartiest thanks to Dr. M. Itoi, whose help in determining the surface tension by the Du Noüy method was invaluable.

REFERENCES

- Biilmann, E. (1921): *Ann. de chimie* **16**, 321.
Domer, E. (1921) *C. r. soc. de biologie* **84**, 393, 594, 683.
Du Noüy, P. L. (1925) *Biochem. Zeitschr.* **155**, 113.
" " " " " " " **165**, 134.
Iscovesco, H. (1910) *C. r. soc. de biologie* **69**, 622.
" " (1911) " " **70**, 11.
Schemensky, W. (1920) *Biochem. Zeitschr.* **105**, 229.
Takeda, M. (1923) *J. of biochem.* **2**, 479.
Tominaga, T. (1923) *Biochem. Zeitschr.* **141**, 248.
Traube, J. (1887) *Z. Physikal. Chem.* **20**, 2644.
Traube, J. (1912) *Kolloidchem. Beihefte* **3**, 27.

ÜBER DIE PARENTERALE ZUFUHR DES ROHRZUCKERS UND INVERTINS.

VON

TOSIO ODA.

(Aus dem medizinisch-chemischen Institut der Universität zu Chiba.

Direktor: Prof S. Akamatsu.)

(Eingegangen am 9. Juni 1928.)

Die Untersuchungen über die Entstehungen der Saccharase bei Tieren nach parenteraler Einführung von Rohrzucker wurden zuerst von Weinland (1906) in Angriff genommen. Er hat beobachtet, dass durch die wiederholte subcutane Injektion von Rohrzucker in steigender Menge die im Harn ausgeschiedene Zuckermenge allmählich abnimmt, und dass das Blut der Tiere nun das Vermögen gewinnt, Rohrzucker zu invertieren. Die Frage dieser Invertinbildung entwickelte sich in zwei Richtlinien.

Einerseits konnten Abderhalden und Brahm (1910) bei den mit teilweise recht grosser Rohrzuckermenge behandelten Hunden in einigen Fällen das Vorkommen von Invertin im Blut nachweisen. Abderhalden und Kapfberger (1910) fanden, dass eine kleine Menge Rohrzucker bei einmaliger parenteraler Injektion an Hunden genügt, schnell und konstant eine Invertinbildung im Blut hervorzurufen. Dieses Resultat wurde später von Abderhalden und Wildermuth (1914) an Kaninchen bestätigt, aber nach den Untersuchungen von Abderhalden und Grigorescu (1914) an Hunden in demselben Jahre war das Auftreten von Ferment nicht regelmässig und soll von ihnen mitunter erst nach wiederholten Injektionen gefunden sein. Diese Ergebnisse bildeten jedoch den Ausgangspunkt der Abderhaldenschen Reaktion.

Anderseits fand Kumagai (1913) bei seinem Experimente. Invertinbildung, dass das Rohrzuckerimmunserum noch die Fähigkeit zeigt, aus Fruktose Milchzucker zu bilden. Röhmann (1916) hat die Resultate von Kumagai anerkannt und

weiter über die Bedeutung der Stereokinase diskutiert, die an der Umbildung des Milchsuckers aus dem Rohrzucker und sogar aus der Stärke teilnehmen soll.

Dass eine so einfache Substanz von bekannter chemischer Struktur wie Rohrzucker bei direkter Einführung in die Blutbahn das Vorkommen des dazu passenden Ferments als Schutzreaktion im Organismus verursachen könne, bietet ein grosses theoretisches Interesse. Die Lehre von der Abderhaldenscher Reaktion ist prinzipiell von grosser Bedeutung und es wird ein sicherer Beweis in naher Zukunft erwartet, und das Problem der Stereokinase dürfte dann noch in anderem Lichte erscheinen.

Gegen diese Angaben über Invertinbildung sprechen aber die folgenden Autoren. Hogan (1914) injizierte Rohrzucker Hunden intraperitoneal, konnte aber kein Invertin im Serum auffinden. Kuriyama (1916), Folkmar (1916) und Knaffl-Lenz (1922) stimmen alle darin überein, dass das Invertin durch parenterale Injektion dieses Disaccharids nicht in Blut hervorgerufen werden kann. Auch Abderhalden (1921, 1922) selbst ist nun der Meinung, dass es nicht möglich sei, bei parenteraler Zufuhr von Rohrzucker das dieses Disaccharid spaltende Ferment im Blut regelmässig und mit Sicherheit hervorzurufen, aber, dass es ausnahmsweise ohne Zweifel gelingen könne, diesen Zustand zu erzielen.

Was mich aufs neue zum Experiment betet, das Invertin im Blut angeregt hat, ist, dass diese ganze Frage weiter gründlich erforscht werden muss; ob der Kampf der Organismen gegen eine so einfache Substanz wie Rohrzucker auch wirklich durch den Abbau veranschaulicht werde. Wie erwähnt, besteht die erste Frage darin, ob das Tier nach parenteraler Injektion von Rohrzucker den reduzierenden Zucker im Urin ausscheide, der ja durch die Wirkung des reaktiv neu auftretenden Ferments gebildet würde. Ich habe im vorliegenden Experiment beobachtet, dass die Ausscheidung des eingeführten Rohrzuckers durch die Niere sehr schnell ausgeführt wird. 1 g Rohrzucker, in die Ohrvenen der Kaninchen injiziert, ist schon in 2.5 Stunden zu

65–76% in Harn wieder zu finden (Versuch 1). Wenn man ausserdem annimmt, dass der möglicherweise abgespaltete Zucker seiner Menge nach vielleicht nur allmählich zunimmt, daran anschliessend aber von Organismen assimiliert werden kann, braucht man nicht ohne weiteres dabei Zuckerharn zu vermuten. Ich habe Kaninchen 1 g Rohrzucker oder 1.44 g Raffinose in die Ohrvenen wiederholt injiziert, konnte aber in keinem Falle den reduzierenden Zucker im Harn nachweisen (Versuch 2, 3). Auch der 10 Minuten oder 6 Stunden nach der Injektion von Hefe- oder Takasaccharase anschliessend eingeführte Rohrzucker ruft niemals Glykosurie hervor (Versuch 6), was mit der Angabe von Kuriyama (1916) übereinstimmt. Die ausgeschiedene Rohrzuckermenge betrug in diesen Fällen 60–87%. Aber da die Exkretion dieses Zuckers nach alleiniger Injektion manchmal nur 70% erreicht (Versuch 2), soll ohne weiteres von Hydrolyse nicht gesprochen werden.

Es muss jedenfalls die zweite Frage entschieden werden: sie lautet, ob das Invertin im Blut eines solch behandelten Tieres vorkommen könne. Meine Experimente hatten ein verneinendes Resultat (Versuch 2, 3).

Die Auseinandersetzungen der erwähnten Autoren blieben bisher nur auf diese beiden Fragen beschränkt. Man weiss aber nun, dass das Reticuloendothelialsystem als zentraler Immunsierungsort von grosser Bedeutung ist und dass der Antikörper in den an Reticuloendothelzellen reichen Organen, besonders in der Leber, Milz und dem Knochenmark, gebildet wird. Obwohl wir weder reduzierenden Zucker im Harn noch Invertin im Blut nachzuweisen im Stande waren, so ist es doch noch verfrüht, wenn wir Bestimmtes über die Fermentbildung aussagen wollen, ohne nach dem Ferment in den Organen des behandelten Tieres zu fahnden. Ich untersuchte darum die Organe nach wiederholter Injektion von Rohrzucker, konnte aber nirgends ein solches Ferment antreffen (Versuch 2, 3). Ich schliesse aus der vorliegenden systematischen Untersuchung, dass das Tier durch die parenterale Einführung von Rohrzucker nicht zur Bildung

oder nicht zur Herauslockung des Invertins angeregt werden kann. Ich möchte hier noch hinzufügen, dass ich keine Lactasebildung bei Rohrzuckerinjektion und keine Raffinasebildung bei Raffinoseinjektion konstatieren konnte (Versuch 2, 3).

An diese Versuche anschliessend ist es von Interesse, das Schicksal des parenteral zugeführten Invertins zu verfolgen. Nogaki (1925) sah, dass das injizierte Invertin aus dem Blut allmählich verschwindet, und schloss aus der Art der Konzentrationsabnahme des Ferments im Blut, dass es sich hier um Adsorption an die Körperzelle mit allmählicher Zerstörung handelt. Samysslow (1925) hat die Geschwindigkeit des Verschwindens des Ferments bei normalen und bei mit Invertinlösung vorbehandelten Kaninchen miteinander verglichen und das Verschwinden des Invertins nicht auf die Zerstörung, sondern auf die Adsorption an Organzellen zurückgeführt. Diese Ergebnisse wurden nachgeprüft und bestätigt. Die injizierte Hefesaccharase verschwindet bei normalen Kaninchen in 6 Stunden aus der Blutbahn (Versuch 4), und durch die wiederholte Immunisierung wird ihr Aufenthalt im Blut allmählich verkürzt. 2 Stunden nach der 4ten Injektion und eine Stunde nach der 5ten ist das Ferment nicht mehr im Blut nachzuweisen (Versuch 4). Das aus dem Blut verschwundene Ferment wurde aber von der Leber, Milz und dem Knochenmark reichlich aufgenommen (Versuch 5). In diesen Organen ist das Ferment auch 20–24 Stunden nach der Injektion noch nachzuweisen, obwohl die hydrolytische Kraft mit der Zeit eine Abschwächung erleidet (Versuch 5).

Es kann die Frage entstehen, ob das aus dem Darm hervorgelockte Ferment oder das eventuell neugebildete Ferment bei der Zirculation sich anders verhält, als das künstlich eingeführte Invertin. Da wir aber auch unter den verschiedenen Bedingungen überhaupt kein Invertin im Blut nachweisen konnten, möchten wir mit anderen Autoren von der Frage überhaupt absehen. Aber wenn das Ferment oder, sozusagen, Fermentbruchstück in Reticuloendothelialzellen schon vorhanden ist,

könnte das Invertin aus diesem immunisatorisch wichtigen System durch Zuckerinjektion hervorgehoben oder wieder aufgebaut und in die Blutbahn ausgesandt werden. Das Experiment negierte aber diese Annahme (Versuch 6).

Wir haben eben gesehen, dass das in Organen aufgespeicherte Invertin auch da eine mit der Zeit sich steigende Abnahme erleidet. Auf welchem Mechanismus diese Fermentabnahme beruht, ist schwer zu sagen. Aber wenn die Hefesaccharase auch *in vitro* mit Organbrei bei 37°C aufbewahrt wird, bleibt die Fermentwirkung unverändert (Versuch 7). Auch das in Organen gespeicherte Ferment erfährt *in vitro* bei 37°C keine Aktivitätsabnahme (Versuch 8). Dieses Verhältnis zeigt, dass das im Laufe der Zeit erfolgende Verschwinden des Invertins in Organen wenigstens nicht auf den hydrolytischen Abbau durch Organfermente zurückzuführen ist. Ich untersuchte darum zunächst die Exkretion des injizierten Invertins. Das Invertin wird nicht im Harn ausgeschieden (Versuch 9). Magen- und Darminhalt enthält normal schon Saccharase in bedeutender Menge (Versuch 10). Ob diese hydrolytische Wirkung auf dem Verdauungsferment oder dem Bakterienenzym beruht, und beim Mageninhalt ausserdem der zurückgeflossene Darmsaft in Erwägung zu ziehen ist, möchte ich in vorliegendem Fall unberührt lassen. Es mag darum dahingestellt bleiben, ob die Ausscheidung des injizierten Ferments durch die Magen- oder Darmwand stattfindet. In Pankreassaft lässt sich das eingeführte Ferment nicht wiederfinden (Versuch 11). Aber merkwürdigerweise enthält die Galle des mit Invertin vorbehandelten Kaninchens das Ferment, wie das in dem Verdauungssaft durch Anlegung der Fistel experimentell nachgewiesen wurde (Versuch 12). Die Galle des normalen Tieres ist frei von Invertin. Es war also bewiesen, dass das parenteral eingeführte Ferment wenigstens zum Teil durch die Leber ausgeschieden wird, obwohl die oxydative Zerstörung *in vivo* nicht ausgeschlossen ist. Jedenfalls ist es von grossem Interesse, dass die Leber, welche nebenbei als Zentralorgan des Intermediärstoffwechsels mit der Niere zusam-

men bei der Exkretion eine grosse Rolle spielt, nun an der Entkräftung des eingeführten körperfremden Ferments teilnimmt.

Ich habe weiter das Verhalten des injizierten Ferments im Körper nach der Tuschenblockierung der Reticuloendothelzellen untersucht. Die Zeit bis zum Verschwinden des Ferments aus dem Blut wird durch diese Vorbehandlung nicht merklich verändert (Versuch 13), aber die Geschwindigkeit der Fermentabnahme scheint etwas verlangsamt. Leber, Milz und Knochenmark können in diesem Fall auch eine gute Menge Ferment aufspeichern. Es wurde das Invertin im Muskel bei zwei und in der Niere bei einem von 5 Fällen beobachtet, wo die Tiere 6 Stunden nach der Fermentinjektion getötet wurden (Versuch 13). Nach 24 Stunden ist das Ferment in der Milz noch nachzuweisen. Durch Tuschenvorbehandlung wurde vielleicht die Blockierung des Reticuloendothelialen Systems nicht vollständig erzielt, aber diese Behandlung kann sicher an der Verteilung des Ferments unter Geweben und Organen eine Änderung hervorbringen. Carmininjektion oder Milzexstirpation konnte die Dauer der Zirkulation des Invertins nicht verlängern (Versuch 14, 15). Tuschenbehandlung bei entmilzten Kaninchen kam zu demselben Resultat (Versuch 15).

Wie erwähnt, wirkt das Invertin, entweder im Blut zirkulierend oder in den Organen aufgespeichert, auf den eingeführten Rohrzucker, nicht hydrolytisch. Dieses Verhältnis wird nicht durch die Wirkung von Adrenalin und Pituitrin und sogar nicht unter Urethannarkose verbessert (Versuch 16, 17). Um das Invertin *in vivo* auf injizierten Rohrzucker wirken zu lassen, musste eine gewaltsame Operation am Kaninchen ausgeführt werden, nämlich die Eviszeration, die von Burn und Dale (1924) bei dem Insulinexperiment angewandt wurde. Die Eingeweide, welche mit der Portader in Zusammenhang stehen, werden alle ausgenommen und die Leber wird jetzt nur von der A. hepatica versorgt. Solche Tiere können, warm bedeckt, über 8 Stunden am Leben erhalten werden. Wenn Rohrzucker allein solchen Tieren eingespritzt wird, wird nur 6–12% davon in 6

Stunden im Harn ausgeschieden, aber kein reduzierender Zucker ist darin nachweisbar (Versuch 18). Injiziertes Invertin ist andererseits nach 6 Stunden noch reichlich im Blut und in den Organen vorhanden (Versuch 18). Bei einem Fall fand ich Ferment nur in geringer Menge im Blut, dagegen reichlich in der Leber. Dies zeigt, dass dieses Organ auch unter solchen Bedingungen seines aufspeichernden Vermögens nicht beraubt ist. Ich konnte auch an solchen Tieren die eingeführte Tusche oder Carmin mikroskopisch in Kupfferschen Sternzellen aufgespeichert nachweisen. Wenn an solchen Kaninchen, bei denen der Lebensprozess sicher stark geschädigt ist, Rohrzucker und Invertin hintereinander in die Blutbahn eingeführt werden, so tritt reduzierender Zucker im Harn auf (Versuch 20), was bei anderen Kaninchen unter verschiedenen Bedingungen niemals beobachtet werden konnte. Dies lehrt aber andererseits, dass die Fahndung nach Zuckerharn als Beweis der Invertinbildung nur eine vergebliche Anstrengung ist.

Experimenteller Teil.

Der ganze Versuch wurde an den Kaninchen ausgeführt, die 1800 - 2500 g wogen. Die Tiere befanden sich einzeln in Käfigen mit einer Einrichtung zur Sammlung des Harns, ohne dass dieser sich mit Kot vermischen konnte. Harn wurde in einem Becher aufgefangen, dem genügend Toluol zugesetzt war. Wenn es nicht besonders in den folgenden Protokollen vermerkt ist, wurden die Untersuchungen an dem während 24 Stunden freiwillig entlassenen Harn ausgeführt. Wenn der Harn in Portionen binnen relativ kurzer Zeit entnommen werden sollte, wurde die Harnblase jedesmal vorher durch Katheterisierung entleert, und nach einer bestimmten Zeit der inzwischen retentierte Harn mit Katheter zum Ausfließen gebracht.

Injizierte Zuckermenge bei 1 g Rohrzucker, 10 ccm 10 % iger Lösung und bei 1.44 g Raffinose, 10 ccm 1.44% iger Lösung. Injektionsstelle: Ohrvenen.

Die ausgeschiedene Rohrzucker- oder Raffinosemenge wurde

polarimetrisch bestimmt. Das Harnvolum wurde zuerst gemessen und ein aliquoter Teil davon wurde, nach schwacher Ansäuerung gegen Lackmus durch ein paar Tropfen Eisessig, mit gepulvertem Quecksilberacetat versetzt, leicht geschüttelt und nach 15 Minuten filtriert. An diesem Filtrat wurde einerseits die optische Drehung gemessen, und andererseits, nach der Entquecksilberung mit Zinkstaub, wurde der reduzierende Zucker nach Trommer oder Benedict gesucht. Da der normale Kaninchenharn nach dieser Behandlung keine Drehung zeigte, und auch der künstlich zugesetzte Rohrzucker, Raffinose oder Traubenzucker in unveränderter Quantität polarimetrisch wiedergefunden werden konnte, und ausserdem, wie in den Protokollen angegeben, kein reduzierender Zucker im Harn nach Saccharidinjektion nachzuweisen war, konnte der ausgeschiedene Rohrzucker oder die Raffinose einfach rechnerisch aus dem Drehungsgrad und dem Harnvolum ermittelt werden. Wenn es sich um Inversionsversuche handelt, so wird das zu untersuchende Gemisch vor und nach der Einstellung in den Brutschrank (37° C) 20 Stunden mit Quecksilberacetat behandelt und polarimetriert. Der Inversionsgrad wird nach der folgenden Formel berechnet:

$$\text{Inversionsgrad (\%)} = \frac{R-l}{R-L} \times 100$$

R: Anfangsdrehung (Drehung bei 0 Stunde)

L: $R \times (0.44 - 0.005 t)$

l: Drehung nach 20 Stunden

Ich habe bei meinem vorigen Kontrollversuch gesehen, dass die frisch hergestellte d-Glukoselösung während dieser Manipulation schon Mutarotationsgleichgewicht erreicht hat. Nach der Entquecksilberung wurde die Reduktionsprobe nochmals ausgeführt. Polarimeter nach Landolt von Firma Schmidt und Haensch. Die Ablesung wurde nach genauer Maasregel in 1 dm Rohr wenigstens 5 mal wiederholt und der Durchschnitt genommen. Fehlergrenze = ± 0.01 Grad.

Hefesaccharaselösung wurde nach Willstätter und Backe

(1920) aus Trockenhefe hergestellt, und die gegen destilliertes Wasser 2 Tage dialysierte Lösung wurde dann mit $\frac{2}{7}$ Mol NaCl auf das doppelte Volum verdünnt und unter Toluol im Eisschrank aufbewahrt. Diese dient zur intravenösen Injektion; 4 ccm pro Kilogramm Körpergewicht des Tieres. 0.3 ccm der Fermentlösung, zu 6 ccm M/2 Acetatpuffer (Ph 4. 7) und 6 ccm 10 % iger Rohrzuckerlösung versetzt und mit Wasser auf 30 ccm verdünnt, ergab in 20 Stunden 37°C Spaltungsgrad von 100 %. Die noch 10 fach verdünnte Fermentlösung übte unter denselben Bedingungen 65 % ige Inversion. Für die lebenswürdige Überlassung der Hefe bin ich der Dai-Nippon Brewery Co. zu Dank verpflichtet. Takasaccharase für Injektion war 5 % Takadiastase, gelöst in physiologischer Kochsalzlösung; 4 ccm pro Kilo Körpergewicht des Tieres. Die Lösung wurde jedesmal frisch aus demselben Vorrat bereitet. 3 ccm von 5 fach verdünnter Lösung (also 1 %), dem Gemisch von 6 ccm 10 % iger Rohrzuckerlösung, 6 ccm M/2 Acetatpuffer (Ph 6. 0) und 15 ccm Wasser zugesetzt, invertiert nach 20 Stunden bei 37°C 62 % des vorhandenen Zuckers.

Die Untersuchungsmethode auf Invertin im Blut und den Organen ist wie folgt: 3 ccm Blut aus den Ohrvenen wird mit einem Körnchen Kalioxalat geschüttelt und mit 10 ccm Wasser hämolysiert. Diese Blutlösung wird mit 6 ccm M/2 Acetatpuffer (Ph 4. 7) und 6 ccm 10 % iger Rohrzuckerlösung versetzt und auf 30 ccm mit Wasser verdünnt und 20 Stunden bei 37°C stehen gelassen. Die Organe werden nach Entblutung durch Carotisschnitt schnell herausgenommen, im Mörser zerstoßen, mit doppeltem Gewicht Wasser im allgemeinen, nur bei Milz und Knochenmark mit 5 fachem Gewicht Wasser, für kurze Zeit digeriert und durch ein Tuch colliert. 3 ccm dieser Organbreisuspension kommt auf die oben erwähnte Rohrzucker- und Pufferlösung und wird auf 30 ccm mit Wasser verdünnt. Das Inversionsgemisch wurde immer mit Toluol überschichtet. Blut oder Organbrei allein hat bei dieser Acidität und zwar in solcher Verdünnung selbst nach 20 Stunden bei 37°C keine messbare

Drehung gezeigt. Die Bestimmung des Inversionsgrads wurde wie oben erwähnt ausgeführt.

Unten ordne ich die Resultate des Experiments zusammen tabellarisch an, da die Ergebnisse schon oben auseinandergesetzt worden sind.

Versuch 1.

Die Geschwindigkeit der Ausscheidung vom intravenös eingespritzten Rohrzucker wurde zuerst untersucht.

TABELLE I.

Zeit		ausgeschiedener Rohrzucker in %	
		0-2.5 St	2.5-5.5 St
Tiere Nr.	1	76	0
	2	63	2

Versuch 2.

3 Kaninchen Nr.3,4,5 wurde Rohrzucker fast jeden Tag (nur, als am nächsten Tage relativ weniger ausgeschiedene Zuckermenge gefunden wurde, wurde Zuckerinjektion zu dem folgenden Tag vorbehalten), oder in Intervallen von 6-7 Tagen injiziert.

TABELLE II.

Tiere Nr.	Datum	Inji- zierter Rohr- zucker (g)	Harn				Anmerkung
			ccm	Dre- hung	Ausge- schied. Rohr- zucker %	Reduk- tions Probe	
Nr. 3	1	1	67	1.01	95	—	Blutuntersuchung am 10. Tage Invertin (—)
	3	1	132	0.45	88	—	
	4	0	140	0.04	9	—	
	5	1	144	0.44	96	—	
	6	1	136	0.42	83	—	
	7	0	96	0.03	5	—	
	8	1	87	0.63	83	—	

Tiere Nr.	Datum	Inji- zierter Rohr- zucker (g)	Harn				Anmerkung
			ccm	Dre- hung	Ausge- schie- d. Rohr- zucker %	Reduk- tions- probe	
Nr. 3	9	0	72	0.03	3	—	
	10	1	89	0.61	83	—	
	18	1	70	0.68	72	—	
	25	1	117	0.50	88	—	
	32	1	45	1.02	69	—	
	33	0	63	0.05	4	—	
Nr. 4	1	1	247	0.27	100	—	Organunter- suchung am 13. Tage: Leber, Milz, Niere, Muskel, Blut, Invertin (—)
	2	1	110	0.60	99	—	
	4	1	146	0.44	97	—	
	5	1	98	0.64	94	—	
	7	1	72	0.77	84	—	
	9	1	97	0.64	83	—	
	11	1	/	/	/	/	
	12	1	/	/	/	/	
Nr. 5	1	1	/	/	/	/	
	7	1	/	/	/	/	
	15	1	110	0.37	61	—	
	18	1	58	0.80	70	—	
	19	0	52	0.12	9	—	
	25	1	147	0.43	97	—	
	32	1	97	0.42	61	—	
	33	0	134	0.10	20	—	

Kaninchen Nr. 6 und 7 erhielten 5 resp. 2 mal Rohrzuckerinjektion in Intervallen von 7 Tagen. 1 Woche nach der letzten Injektion wurden sie getötet. Leber, Milz, Niere, Muskel und Blut enthielten kein Invertin und Lactase.

Versuch 3.

Raffinoseinjektion wurde wie bei den vorigen Versuch ausgeführt.

TABELLE III.

Tiere Nr.	Datum	Injizierte Raffinose- Menge (g)	Harn					Anmerkung
			ccm	Drehung	Ausgeschiedene Raffinose		Reduktions- probe	
					g	%		
Nr. 8	1	1.44	63	1.97	1.19		—	Organ- untersuchung: am 9. Tage: Leber, Milz, Niere, Muskel, Blut Invertin (—)
	2	0	61	0.09	0.05	86	—	
	4	1.44	113	1.19	1.22	88	—	
	5	1.44	97	1.44	1.34	93	—	
	7	1.44	79	1.58	1.19	82	—	
	8	1.44	/	/	/	/	/	
Nr. 9	1	1.44	126	0.53	0.64		—	
	3	0	130	0.50	0.62	88	—	
	4	1.44	219	0.68	1.41	98	—	
	5	1.44	74	1.69	1.19		—	
	6	0	125	0.15	0.18	85	—	
	8	1.44	81	1.58	1.21	85	—	
	15	1.44	111	1.30	1.37	95	—	
	22	1.44	176	0.66	1.11	77	—	
	29	1.44	111	1.08	1.14		—	
	30	0	130	0.19	0.23	95	—	

Kaninchen Nr. 10 und 11 erhielten 3 resp. 5 mal Raffinoseinjektion in Intervallen von 7 Tagen. Eine Woche nach der letzten Injektion wurden Leber, Milz, Muskel und Blut als raffinase- oder lactasefrei erwiesen.

Versuch 4.

Hefesaccharase 4 ccm pro kilo wurde dem Kaninchen Nr. 12 in die Ohrvene eingeführt und im zeitweise herausgenommenen Blut wurde das Invertin gesucht. Die Zeitdauer, welche das Verschwinden des Ferments beanspruchte, ist in der Tabelle zu sehen.

Den Kaninchen Nr. 13, 14 und 15 wurden jeden 7. Tag Hefeinvertin eingespritzt, den ersten 2 Tieren 4 mal, dem

letzteren 5 mal. Bei jeder letzten Injektion wurde die Zeitdauer der Abnahme des Invertins aus Blut wie oben untersucht.

TABELLE IV.

Tiere Nr.		Spaltungsgrad in %			
		12	13	14	15
	1/6	87	93	83	62
Zeit nach der Fermentinjektion (St.)	1	/	6	4	0
	2	7	+	0	0
	3	/	0	0	/
	4	2	0	/	/
	6	0	/	/	/

Die Kaninchen Nr. 14 und 15 wurden gleich nach der Blutentnahme getötet, um das Ferment in den Organen zu suchen. Das Resultat wird einfachheitshalber in der Tabelle V. zusammengestellt.

Versuch 5.

Den Kaninchen Nr. 16, 17, 18, 19, 20 und 21 wurde das Ferment in die Ohrvenen injiziert. Nachdem das Ferment aus der Blutbahn verschwunden war, wurden die Tiere getötet und an den Organen wurde das Ferment gesucht, um die Wirkung des injizierten Ferments festzustellen.

TABELLE V.

Kaninchen Nr.		Spaltungsgrad in %							
		16	17	18	19	20	21	14	15
•Zeit (St.)		6	6	20	20	24	24	2	2
Organ	Leber	36	31	/	/	7	14	30	48
	Milz	3	2	+	0	0	0	8	2
	Knochenmark	/	/	24	10	/	/	/	/
	Niere	0	0	0	0	0	0	0	0
	Muskel	0	0	0	0	0	0	0	0
	Blut	0	0	0	0	0	0	0	0
	Harn	/	/	/	/	0	0	/	/

•In der Tabelle versteht man unter Zeit den Zeitraum zwischen Fermentinjektion und Carotisschnitt.

Versuch 6.

Rohrzuckerzufuhr (1 g) erfolgte 10 Min. (bei den Kaninchen Nr. 22 und 23) oder 6 St. (bei den Nr. 24 und 25) nach der Injektion des Invertins (pro kilo. 4 ccm). Man weiss nun, dass innerhalb 6 Stunden das injizierte Ferment schon in oben untersuchten Organen aufgespeichert worden ist.

TABELLE VI.

Tiere Nr.	22	23	24	25
Ausgeschiedener Rohrzucker %	69	69	87	73
Reduktions-Probe	—	—	—	—

Versuch 7.

Dieser Versuch ergibt den Einfluss des Organbreis auf die Hefesaccharase.

Das normale Kaninchen Nr. 26 wurde durch Entbluten aus der Carotis getötet, und aus jedem der herausgenommenen Organe wurde die Organbreisuspension wie oben erwähnt hergestellt. Diese Suspension wurde mit gleichem Volum verdünnter (1 : 50) Hefesaccharaselösung vermischt.

A) Ein Teil (3 ccm) davon wurde sogleich in das Rohrzucker-Puffergemisch, nämlich 6 ccm 10% iger Rohrzucker + 6 ccm Acetatpuffer (Ph 4. 7) + 15 ccm Wasser, gebracht und der Inversionsgrad nach 20 Stunden wie üblich bestimmt.

B) Ein anderer Teil wurde nur mit Toluol überschichtet und 24 Stunden bei 37°C gelassen, und dann wurden 3 ccm davon in das Rohrzucker-Puffer-Gemisch wie früher getan.

TABELLE VII.

Organ	Spaltungsgrad in %					
	Leber	Milz	Niere	Knochenmark	Muskel	Galle
A	57	57	57	49	56	41
B	57	57	57	50	56	40

Versuch 8.

6 Stunden nach der Hefesaccharaseinjektion wurde das Kaninchen Nr. 27 durch Entblutung getötet. Zu dieser Zeit ist das Invertin nicht mehr im Blut vorhanden, sondern reichlich aufgespeichert in der Leber, wie es bei Versuch 5 der Fall war. Die Leber wurde dann herausgenommen, und die daraus wie üblich hergestellte wässrige Suspension wurde in 3 Portionen geteilt. Es kamen ein Teil (A) sofort, ein anderer Teil (B) nach 24 stündigem Stehen unter Toluol in dem 37°C Brutschrank und der dritte Teil (C) nach 24 stündiger Aufbewahrung in den Eisschrank zur Vergleichung der Inversionskraft nach der erwähnten Methode.

TABELLE VIII.

	Spaltungsgrad in %
A	50
B	51
C	51

Versuch 9.

Ich habe 4 Kaninchen, Nr. 28, 29, 30 und 31, 10 Tage jeden Tag einmal die Invertinlösung eingespritzt. Am elften Tage wurde je 1 g Rohrzucker eingespritzt. Blutuntersuchungen am 12 ten Tage waren alle negativ. Kaninchen 28 und 29 erhielten noch fortgesetzt jeden Tag 7 Tage lang Zuckerinjektion. Die letzten zwei erhielten statt dessen nur eine zweite Zuckerinjektion am 8 ten Tage. Am nächsten Tage wurden die Tiere auf Invertin im Blut untersucht. Alles negativ.

Versuch 10.

Kaninchen Nr. 32 und 33 hatten 2 Tage gehungert und bekamen Hefesaccharaseinjektion. Nach 8 Stunden (nun ist das Blut invertinfrei) wurde die Bauchwand aufgemacht, und der Magen wurde zuerst am Pylorus, dann an der Cardia doppelt gebunden und herausgeschnitten. Dann folgte die Entnahme

des 2 Meter langen Dünndarmes, vom Pylorus gemessen. Kaninchen Nr. 34 und 35 hungerten ebensolang, ihr Magen und Dünndarm diente zu Kontrollversuchen. Das Darmstück wurde mit 20 ccm physiologischer Kochsalzlösung ausgespült. 3 ccm des mit N-NaOH neutralisierten Magensaftes und des Darmwaschwassers dienten zur Invertinuntersuchung nach erwähnter Methode.

TABELLE IX.

Tiere Nr.		Versuch		Kontrolle	
		32	33	34	35
Spaltungsgrad	Mageninhalt	45	78	70	100
in %	Darminhalt	13	33	27	13

Versuch 11.

Dieser Versuch zeigte, dass das eingespritzte Invertin nicht im Pancreassaft sezerniert wird. Gleich nach der Injektion des Ferments wurde zwei Kaninchen, Nr. 36 und 37, die Glaskanüle in den Ductus pancreaticus eingeführt. Das Tier Nr. 36 lieferte 0.5 ccm Saft in 6 Stunden und Nr. 37 0.3 ccm in 8 Stunden. Jeder Saft wurde mit 2 ccm 10% Rohrzuckerlösung und 2 ccm M/2 Acetatpuffer (Ph 4. 7) versetzt und mit Wasser auf ein Volumen von 10 ccm verdünnt. Nach 20 Stunden bei 37°C fand sich der Rohrzucker polarimetrisch unverändert. Nach Entquecksilberung auch negative Trommersche Probe.

Versuch 12.

Anschliessend an die Invertininjektion wurde die Glaskanüle an den Ductus choledochus angelegt. Kaninchen Nr. 38, 39 und 40 ergaben 55, 69, resp. 70 ccm Lebergalle. 10 ccm des Saftes wurde mit 6 ccm Rohrzuckerlösung (10%), 10 ccm M/2 Acetatpuffer (Ph 4. 7) und 4 ccm Wasser gemischt und auf Invertin untersucht. Spaltungsgrad ist wie folgt:

TABELLE X.

Kaninchen Nr.	Versuch			Kontrolle	
	38	39	40	41	42
Spaltungsgrad(%)	4	6	5	0	0
Trommer	+	+	+	—	—

Kontrollversuch ohne Fermentinjektion an Kaninchen Nr. 41 und 42 ergab keine Inversion und negative Reduktionsprobe.

Versuch 13.

Tuschensuspension für Blockierung der Reticuloendothelialen Zellen wurde durch 3/4 stündige gleichmässige Reibung der reinen chinesischen Tusche mit 30 ccm physiologischer Kochsalzlösung auf „Akamasuzuri“, hergestellt und nach Kolieren durch ein Tuch dampfsterilisiert. 5 ccm der Tuschensuspension pro Kilo bekamen Kaninchen als Injektion in die Ohrvenen. Die Zeitdauer der Abnahme des eingespritzten Hefeinvertins an den 3 Tage täglich einmal mit Tusche behandelten Kaninchen Nr. 43, 44 und 45 verlangsamt sich etwas im Vergleich mit dem Versuch 4.

TABELLE XI.

Kaninchen Nr.		Spaltungsgrad in %		
		43	44	45
Zeit (St.)	2/3	91	91	87
	2.5	23	18	20
	4.5	2	2	3
	6.5	+	0	0

Die Verteilung des injizierten Invertins unter Organen bei mit Tusche behandelten Kaninchen Nr. 46, 47, 48, 49 und 50 ist wie folgt: Die Untersuchungsmethode war dieselbe wie bei Versuch 5.

TABELLE XII.

Kaninchen Nr.		Spaltungsgrad in %				
		46	47	48	49	50
Organ	Leber	40	25	25	12	40
	Milz	6	1	4	1	16
	Knochenmark	/	/	5	10	/
	Niere	0	1	0	+	0
	Muskel	25	6	0	0	0
	Blut	0	0	0	+	0

Versuch 14.

Mercks Carmin (4%) in 2% iger Natriumcarbonat-Lösung wurde dampfsterilisiert und filtriert. Kaninchen Nr. 51, 52 und 53 bekamen während einer Woche Injektionen von 42 resp. 50 ccm der Natroncarminlösung in die Ohrvenen.

Dauer der Zirculation des Ferments (Tabelle XIII) und dessen Verteilung unter die Organe (Carotisschnitt 6 Stunden nach Fermentinjektion) (Tabelle XIV) wurden untersucht.

TABELLE XIII.

Nr. 51		Spaltungsgrad in %
	1/4	90
Zeit (St.)	1	70
	3	1
	6	0

TABELLE XIV.

Spaltungsgrad in %			
Kaninchen Nr.		52	53
Organ	Leber	19	53
	Milz	5	/
	Niere	0	0
Muskel (0), Blut (0), Harn (0).			

Versuch 15.

Derselbe Versuch wie der vorige bei entmilzten Kaninchen Nr. 54 und 55 2 Tage nach der Operation ergibt nichts besonderes.

TABELLE XV.

Spaltungsgrad in %				Anmerkung
Nr.		54	55	Kaninchen Nr. 54
	1/4	66	83	nach 6.5 St. getötet.
Zeit	2	8	2	Spaltungsgrad:
(St.)	4	2	1	Leber 33. %
	6	0	0	andere Organe (0)

2 Kaninchen Nr. 56 und 57 wurde nach der Milzextirpation 3 Tage lang täglich einmal chinesische Tusche eingespritzt. Derselbe Versuch wie der vorige ist unten angegeben.

TABELLE XVI.

Nr.		Spaltungsgrad in %		Anmerkung
		56	57	
	1/4	95	85	Nr. 57 nach 7 St. getötet.
Zeit	1	76	54	Spaltungsgrad:
(St.)	3	4	2	Leber 13 %
	6	+	+	Herz, Muskel, (Spur)
	7	+	0	Nr. 56 nach 24 St. getötet.
				Leber 28 %
				andere Organe (0).

Versuch 16.

Der Einfluss des Adrenalins und Pituitrins auf die Ausscheidung des Rohrzuckers oder auf die Wirkung des Invertins *in vivo* war der Gegenstand des vorliegenden Versuchs.

A) 15 Min. nach der Injektion von Hefesaccharase, intravenöse 0.3 ccm Adrenalin (1/1000) oder 1 ccm Pituitrin (0.5 %) Injektion und fast gleichzeitige Rohrzuckereinspritzung.

B) 6 St. nach der Fermentinjektion, sonst wie A.

C) Kontrolle ohne vorherige Fermentinjektion.

TABELLE XVII.

Adrenalin	A		B		C	
Nr.	58	59	60	61	62	63
Ausgeschiedener Rohrzucker in %	72	68	95	78	95	84
Trommer	—	—	—	—	—	—

Pituitrin	A		B			
Nr.	64	65	66	67		
Ausgeschiedener Rohrzucker in %	53	83	92	84		
Trommer	—	—	—	—		

Versuch 17.

Subcutane Injektion von 1 g Urethan in wässriger Lösung pro Kilogramm führte tiefe Narkose bei Kaninchen herbei. Einfluss der Narkose auf Zuckerausscheidung im Harn (Tabelle XVIII) und Fermentabnahme im Blut (Tabelle XIX) ergibt sich wie folgt.

TABELLE XVIII.

Urethan	A (Versuch)		B (Kontrolle)	
Nr.	68	69	70	71
Ansgeschiedener Rohrzucker in %	51	58	85	76
Trommer	—	—	—	—

TABELLE XIX.

Spaltungsgrad in %				
Nr.		72	73	74
Zeit (Std.)	2/3	95	98	98
	3	30	6	19
	6	0	0	0

Versuch 18.

Evisceration wurde unter Urethannarkose, 1 g subcutan pro Kilo. ausgeführt. Die Operationstechnik ist in der Arbeit von Burn und Dale nachzusehen. Warme Bedeckung des ganzen Körpers und besonders der Bauchwand hält die behandelten Tiere über 8 Stunden am Leben. Solchen Tieren wurden 4 ccm Hefesaccharaselösung pro Kilogramm in die Ohrvenen injiziert und nach 6 Stunden wurde die Verteilung des Ferments in den einzelnen Organen experimentell untersucht. Untersuchungsmethode wie früher.

TABELLE XX.

Spaltungsgrad in %						
	Nr.	75	76	77	78	79
Organ	Leber	26	89	75	3	63
	Knochenmark	77	14	96	99	87
	Niere	77	22	6	15	13
	Muskel	4	0	1	0	5
	Blut	100	1	45	84	98
	Harn	0	0	0	0	0

Die Resultate stimmen nicht miteinander überein, aber dass das Invertin noch in der Zeit, als es bei normalen Kaninchen schon aus dem Blut verschwunden war, hier noch manchmal in beträchtlicher Menge nachzuweisen ist, ist ein bemerkenswertes Ergebnis. Es handelt sich hier sicher um die abgeschwächte Lebenskraft der Tiere. Dazu kommt noch die durch Portaderschnitt verursachte Veränderung der Blutversorgungsverhältnisse der Leber, welches Organ bei so behandelten und milzlosen Tieren ausser dem Knochenmark sonst bei der Speicherung der fremden Substanz eine grosse Rolle spielen soll. Aber unter solchen Bedingungen vermag noch die Leber das Invertin aufzuspeichern, wie in der Tabelle zu sehen ist. Besonders auffallend ist bei Fall Nr. 76, dass Invertin reichlich in diesem Organ vorhanden ist, obwohl es aus dem Blut schon fast ver-

schwunden war. Das durch die Leberarterie eingeströmte Blut kann dieses Organ nicht ohne Beeinflussung der Kupfferschen Sternzellen verlassen. Dies wurde an derart behandelten Kaninchen auch dadurch bestätigt, dass die intravenös eingespritzte Tusche oder Carmin aufgespeichert in Kupfferschen Sternzellen unter dem Mikroskop beobachtet werden konnte.

Versuch 19.

Als anderseits nur Rohrzucker solch eviscerierten Kaninchen injiziert wurde, war die ausgeschiedene Menge viel weniger als bei normalen und sonst behandelten Tieren. Harn musste dabei mittels des Katheters entnommen werden.

TABELLE XXI.

Nr.	80	81
Ausgeschiedener Rohrzucker (%)	6	13
Benedict	—	—

Ebenso war bei diesen 2 Tieren wie bei 4 des vorigen Versuches im Harn keine reduzierende Substanz nach Quecksilber und Zinkbehandlung nachweisbar. Dies dient als Kontrolle zu dem folgenden Versuch.

Versuch 20.

Rohrzucker und Invertin wurden fast gleichzeitig, aber getrennt in jede Ohrvene eingespritzt. Nach 6 Stunden wurde Harn auskatheterisiert. Nach Quecksilberfällung und Entquecksilberung war die Reduktionsprobe stark positiv. *In vivo* kann wohl Rohrzucker von Invertin angegriffen werden, aber nur unter der Bedingung, dass dieser Zucker in der Ausscheidung nicht gehindert, im Blute weiter zirkuliert.

Versuch 21.

Untersuchung mit Takadiastase ergab mit Hefeinvertin übereinstimmendes Resultat. Auf genaue Zahlen möchten wir verzichten.

LITERATUR.

- Abderhalden (1921): Bioch. Zeitsch., **117**, 161.
„ (1922): Zeitschr. für physiol. Chemie **121**, 283.
Abderhalden u. Brahm (1910): Zeitschr. für physiol. Chemie, **64**, 429.
Abderhalden u. Grigorescu (1914): Zeitschr. für physiol. Chemie, **20**, 419.
Abderhalden u. Kapfberger (1910): Zeitschr. für physiol. Chemie, **69**, 23.
Abderhalden u. Wildermuth (1914): Zeitschr. für physiol. Chemie, **90**, 388.
Burn u. Dale (1924): Journal of Physiology. **59**, 164.
Folkmar (1916): Bioch. Zeitsch., **76**, 1.
Hogan (1914): J. Biol. Chem., **18**, 485.
Knafl-Lenz (1922): Zeitschr. für physiol. Chemie, **120**, 110.
Kumagai (1913): Bioch. Zeitsch., **57**, 380.
Kuriyama (1916): J. Biol. Chem. **25**, 521.
Röhmnn (1916): Bioch. Zeitsch., **72**, 26.
Weinland (1906): Zeitschr. für Biologie, **47**, 279.
Willstätter u. Backe (1920): Liebigs Ann. d. Chem., **425**, 1.

ÜBER DIE SPEZIFISCHE HÄMOLYSE.

I. Die reversible Adsorption des Hämolsins und des Komplements.

VON

KEIICHI HORINO.

*(Aus dem medizinisch-chemischen Institut der medizinischen
Akademie zu Chiba. Direktor: Prof. S. Akamatsu.)*

(Eingegangen am 9. Juni 1928.)

Über das Adsorptionsverhalten des Hämolsins und Komplements sind schon viele Angaben vorhanden. Hauptsächlich wurde aber dabei die Abschwächung oder das Verschwinden der Wirkung beobachtet und daraus ohne weiteres von Adsorption geredet. Den Beweis einer Adsorption im echten Sinne durch die Reversibilität zu führen, wurde nur in wenigen Fällen versucht.

Die Adsorptionsmethode, welche von Willstätter für die Fermentforschung aufgenommen wurde, hat schon viele eklatante Resultate gebracht. Ich habe nun diese Methode auf Hämolsin und Komplement angewandt. Hämolsin ist Kaninchenserum, das wie üblich durch wiederholte Immunisierung mit gewaschenen Ziegenerythrocyten gewonnen wurde. Es wurde durch Erhitzung auf 56°C 30 Minuten inaktiviert und im Eisschrank aufbewahrt. Karbolzusatz wurde weggelassen, da dieses antiseptische Mittel bei den Adsorptionsversuchen eine Verwirrung verursachen könnte. Das in diesem Experiment gebrauchte Antiserum konnte bei der Verdünnung 1/5000–1/10000 zusammen mit 10-fach verdünntem Komplement eine Komplethämolyse ausüben. Dieses Hämolsin wurde beim Experiment über seine Adsorption unverdünnt gebraucht, um den vorhandenen Antikörper in der Adsorptionsrestlösung oder in dem Elut bei verschiedenen Fällen leicht miteinander vergleichen zu können. Wenn es sich dagegen um die Prüfung

auf das vorhandene Komplement handelt, steht das Hämolysin in verdünnter Lösung und zwar bei 2–3 hämolytischer Einheit zur Verfügung. Komplement: Meerschweinchenserum. Inaktivierung des Komplements wurde wie üblich durch halbstündiges Erwärmen bei 56° erzielt. Ziegenerythrocyten: 5%ige Suspension in $\frac{1}{7}$ Mol NaCl nach 3 maliger Auswaschung des Serums. Aseptische Massregeln wurden streng gehalten. Jedes hämolytische System wurde 2 Stunden in den Brutschrank (37°C) und dann bis zum nächsten Morgen in den Eisschrank gestellt. Das Resultat wird in den Protokollen angegeben wie folgt: vollständige Hämolyse, +++; starke, ++; mässige, +; geringe, \pm ; und negative, –.

Kaolin wurde nach Kochen mit Salzsäure bis chlorfrei gewaschen und getrocknet. Tonerdesuspension wurde nach Willstätter (1923) aus Aluminiumsulfat hergestellt und beim Gebrauch auf das Doppelte mit $\frac{2}{7}$ M NaCl verdünnt. In den Protokollen versteht man unter Tonerde diese in physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmte Suspension, 1 cc davon enthält 1.6 mg $\text{Al}(\text{OH})_3$.

Wir haben in dem vorliegenden Versuch die Adsorption und die Elution des Hämolysins und Komplements behandelt. Variierende Acidität wurde mit Citrat-Salzsäure oder Phosphatgemisch hergestellt. Was wir aber bei der Schätzung der Resultate besonders berücksichtigt haben, war eine Kontrolle hinsichtlich der Erhaltung der Isotonie und der die spezifische Hämolyse betreffenden Acidität. Dies wurde in folgender Weise erzielt:

Wir haben vorher $\frac{1}{7}$ M KH_2PO_4 und $\frac{1}{7} \times \frac{4}{5}$ M K_2HPO_4 kryoskopisch als isotonisch ($\Delta = -0.56^{\circ}$) ermittelt. Um den P-Gehalt bei verschiedenem Mischungsverhältnis konstant zu erhalten, wurde eine $\frac{1}{7}$ Mollösung von KH_2PO_4 hergestellt und deren 4 faches Volum wurde mit einem Volum von $\frac{1}{7}$ Mol NaCl gemischt. Diese Lösung wurde unten in den Protokollen I Phosphat genannt. II Phosphat bedeutet $\frac{1}{7} \times \frac{4}{5}$ Mollösung von K_2HPO_4 . Phosphat war in den Versuchen im allgemeinen noch

in 5–10 fach isotonisch verdünnter Konzentration vorhanden.

Wir haben vorher ausserdem noch sichergestellt, dass, wenn die Proportion I:II Phosphat weniger als 1:3 ist oder selbst der Puffer ausschliesslich aus II Phosphat besteht, das Blutkörperchen soweit es sich um unsere Versuchsanordnung handelt, wohl intakt bleibt und die spezifische Hämolyse praktisch keine Hemmung erleidet. Wenn aber die Proportion grösser als 1/3 ist, d. h. I Phosphat sich vermehrt, so wird die Auflösung der Erythrocyten einfach von einer Säurereaktion verursacht. Wenn die Adsorption oder Elution also bei solchem Phosphatgemisch ausgeführt wird, muss die Adsorptionsrestlösung oder das Elut durch Zusatz von Alkalilösung (P) und zwar unter Isotoniebehaltung zu der Acidität wie bei I:II Phosphat 1:4 zurückgebracht werden. Als Alkalilösung (P) wurde das Gemisch von 1 Volum $\frac{4}{7}$ M NaOH und 4 Volum $\frac{1}{7}$ NaCl gebraucht. Die zuzusetzende Menge beträgt $A = \frac{4}{5}(I + II)cc - IIcc$. Die Erklärung über dieses Volum und die Zusammensetzung der zusetzenden Alkalilösung ist wie folgt. $\frac{4}{5}(I + II) - IIcc$ bedeutet die überschüssige Menge von I Phosphatlösung, welche isotonisch in II Phosphat umgewandelt werden soll, um das Mischungsverhältniss zu 1:5 aufzubringen. Theoretisch kann $\frac{1}{4}$ Mol-lösung KH_2PO_4 durch Zusatz von derer $\frac{1}{4}$ Volum $\frac{4}{7}$ Mol KOH zu $\frac{1}{4} \times \frac{4}{5}$ Mol Lösung K_2HPO_4 verändert werden.

Diese beiden Phosphatlösungen sind ja, wie oben erwähnt, isotonisch. Da aber unsere I Phosphatlösung aus 4 Volum $\frac{1}{7}$ M KH_2PO_4 + 1 Volum $\frac{1}{7}$ M NaCl besteht, muss die zuzusetzende $\frac{4}{7}$ M KOH an $\frac{4}{5} \times \frac{1}{4} = \frac{1}{5}$ von dem Volum (A) der überschüssigen I Phosphatlösung betragen. Dies wird durch die Zufuhr von A Volum von der Alkalilösung in der oben angegebenen Zusammensetzung gemacht. Im ganzen Hämolyseversuch wurde die Adsorptionsrestlösung oder das Elut endlich auch mit $\frac{1}{7}$ M NaCl auf ein bestimmtes Volum verdünnt, um die Resultate mit einander vergleichen zu können. Wenn ein aliquoter Teil der Adsorptionsrestlösung oder des Elutes genommen wird, muss die zusetzende Menge der Alkalilösung ent-

sprechend vermindert werden.

Als der Phosphatpuffer zur Erzeugung der sauren Reaktion nicht hinreichte, kam stattdessen das Citratgemisch zum Gebrauch. Dieses Gemisch besteht bekanntlich aus dem bestimmten Volum von sekundärer Citratsalzlösung und der variierenden Menge der Salzsäure. Konzentration der Citratlösung wurde unter Berücksichtigung der Dissoziation als $\frac{1}{4} \times \frac{2}{3}$ Mol ausgerechnet und durch Vermischen des 1 Volums von $\frac{2}{7}$ Mol Lösung Citronensäure mit 2 Volumen von $\frac{2}{7}$ M NaOH-Lösung hergestellt. Die andere Komponente des Puffers ist ein Gemisch von gleichen Teilen $\frac{1}{7}$ M Salzsäure und $\frac{1}{7} \times \frac{2}{3}$ M NaCl Lösung. Das Citratgemisch behält also Isotonie. Um die Acidität bei den Hämolyseversuchen mit Adsorptionrestlösung oder Elut unter Isotoniebeibehaltung abzustumpfen, wurde folgendes ausgeführt. Das ursprünglich vorhandene sekundäre Citrat kann durch Zusatz eines Drittels seines Volumens von $\frac{2}{7}$ Mol NatronlaugeLösung zu $\frac{1}{4} \times \frac{1}{2}$ Mol Trinatriumcitratlösung umgewandelt werden. Die Salzsäurelösung, welche vorher der Citratlösung zugesetzt geworden war, kann mit dem gleichen Volum Alkalilösung (C) neutralisiert werden, die im diesem Fall aus gleichen Teilen von $\frac{1}{7}$ Mol NaOH-Lösung und $\frac{1}{7} - \frac{2}{3}$ Mol NaCl Lösung hergestellt wird. Wenn ein Teil der Adsorptionsrestlösung oder des Elutes zum Gebrauch kommt, müssen die neutralisierenden Alkalilösungen dem entsprechend verringert werden.

Bei den Hämolyseversuchen wird die isotonisch neutralisierte Lösung noch auf ein bestimmtes Volum mit $\frac{1}{7}$ Mol NaCl aufgefüllt.

Allgemeine Versuchsanordnung wird zusammen hier angegeben werden.

Bei dem Adsorptionsversuch wurde das ganze Volum, das Hämolysin oder Komplement, Puffer und Adsorptionsmittel enthält, in ein Wasserbad von 37°C eine Stunde unter zeitweisem Schütteln gestellt und dann von dem Adsorptionsmittel stark abzentrifugiert. Die überstehende Flüssigkeit wird, nötigen-

falls nach der Neutralisation in oben erwähnter Weise, auf ein bestimmtes Volum mit Kochsalzlösung aufgefüllt. Man stellt von dieser Lösung ausgehend eine geometrische Reihe her mit dem Quotienten 2 durch stufenweise Verdünnung mit 1/7 Mol NaCl. 1 ccm jeder Verdünnung wird mit 1 ccm Blutzellensuspension und 1 ccm Komplement (1:10) oder Hämolsin (2–3 Einheiten), je nach dem Zweck der Untersuchung, vermischt.

Bei dem Elutionsversuch wurde das oben beschriebene abzentrifugierte Kaolin oder Tonerdebodensatz mit einer gepufferten Lösung bei Zimmertemperatur 1 Stunde lang auf Maschinen geschüttelt und wieder stark abzentrifugiert. Die überstehende Flüssigkeit wird wie bei dem Adsorptionsversuch behandelt und zum Experiment in oben erwähnter Weise gebraucht.

Bei allen Versuchen mussten selbstverständlich Kontrollversuche angestellt werden: ob die untersuchte Adsorptionsrestlösung oder das Elut allein die Blutzellen auflöst und ob das bei Hämolsinversuch gebrauchte Komplement (1/10) oder Hämolsin (2–3 Einheiten) allein die Hämolyse verursacht. Da derartige Kontrollen in allen unseren Versuchen negativ abgelaufen sind, möchte ich einfachheitshalber auf die Angabe der einzelnen Versuche verzichten.

Versuch 1.

Adsorptionsverhalten des Hämolsins an Kaolin bei Phosphatpuffer.

Hämolsin	0.5 ccm	37°C 1 St.	Übrigbleibende Flüssigkeit	10.0 ccm
I+II Phosphat	4.0 ccm			
M/7 NaCl	15.5 ccm		Alkalilösung (P)+M/7 NaCl	2.0 ccm
Kaolin	1 g		auf Hämolsin untersucht	12.0 ccm

(+)

Phosphat I:II	Verdünnungsgrad				
	1	1/2	1/4	1/8	1/16
4:0	+++	+++	++	++	++
2.4:1.6	+++	+++	+++	+++	++
2:2	+++	++	++	++	++
1.6:2.4	+++	+++	+++	++	++
0:4	+++	+++	+++	+++	+++

*Versuch 2.**Adsorptionsverhalten des Hämolysins an Tonerde bei Phosphatpuffer*

Hämolysin	0.5 ccm	37°C 1 St.	Übrigbleibende Flüssigkeit	10 ccm
I+II Phosphat	4.0 ccm		Alkalilösung (P)+1/7 M NaCl	2 ccm (+)
Tonerde	15.5 ccm		auf Hämolysin untersucht	12 ccm

Phosphat I:II	Verdünnungsgrad				
	1	1/2	1/4	1/8	1/16
4:0	++	++	++	++	++
1.6:2.4	++	++	++	++	++
2:2	++	++	++	++	++
2.4:1.6	++	++	++	++	++
0:4	+++	+++	+++	+++	+++

In dem Aciditätsbereich, soweit mit Phosphatgemisch unter unserer Anordnung hergestellt, wird das Hämolysin weder von Kaolin noch von Tonerde in merklicher Menge aufgenommen.

*Versuch 3.**Adsorption des Hämolysins an Kaolin bei Citratpuffer*

Hämolysin	0.5 ccm	37°C 1 St.	Übrigbleibende Flüssigkeit	10 ccm
Citrat	1.0 ccm		2/7 M NaOH	0.16 ccm
Salzsäurelösung	p ccm		Alkalilösung (C)	p/2 ccm
1/7 M NaCl	18.5-p ccm		1/7 M NaCl	1.84-p/2 ccm (+)
Kaolin	1 g		auf Hämolysin untersucht12 ccm

Puffer Citrat : HCl-lösung	Verdünnungsgrad				
	1	1/2	1/4	1/8	1/16
1:0	++	++	++	+	+
1:1	++	++	++	++	+
1:2	++	++	+	+	+

Die Adsorption des Hämolysins an Kaolin scheint in der

Acidität des Citratpuffers etwas günstiger als bei Phosphat, aber sie ist noch nicht hinreichend.

Versuch 4.

Adsorption des Hämolysins an Tonerde bei Citratpuffer

Hämolysin	0.5 ccm	37°C 1 St.	Übrigbleibende Flüssigkeit	10 ccm
Citrat	1.0 ccm		2/7 M NaOH	0.16 ccm
Salzsäurelösung	p ccm		Alkalilösung (c)	p/2 ccm
Tonerdesuspension	15.5 ccm		1/7 M NaCl	1.84-p/2 ccm
1/7 M NaCl	3-p ccm		auf Hämolysin untersucht12 ccm (+)

Puffer Citrat : HCl-Lösung	Verdünnungsgrad				
	1	1/2	1/4	1/8	1/16
1:0	+	+	—	—	—
1:1	—	—	—	—	—
1:2	—	—	—	—	—

Wenn der zugesetzte Citratpuffer aus dem Gemisch von 1:1 oder 1:2 besteht, ist eine vollständige Adsorption des Hämolysins an Tonerde zu finden. Um aber von Adsorption sprechen zu können, muss die Elution verwirklicht werden, sonst fehlt der Beweis einer Adsorption im echten Sinne. Wir haben die Reversibilität der Adsorption wie folgt nachgewiesen.

Versuch 5.

Tonerdebodensatz, der das Hämolysin wie im vorigen Versuch bei Gegenwart von Citratpuffer 1:1 mitgerissen haben soll, wurde mit dem Gemisch von 16 ccm 1/7 M NaCl + 4 ccm 1/7 × 4/5 M K₂HPO₄ eine Stunde lang geschüttelt und abzentrifugiert. Mit der überstehenden Flüssigkeit wurden die Hämolyseversuche angestellt.

Verdünnungsgrad	1	1/2	1/4	1/8	1/16
Hämolyse	+++	+++	+++	+++	++

Die Kontrollversuche waren negativ. Kaninchenerythrocyten blieben intakt.

Hämolysin kann also unter Behaltung der Spezifität reversibel adsorbiert werden.

Versuch 6.

Eluierende Wirkung des sekundären Phosphates mag auf seine Alkalizität zurückgeführt werden. Dann kann die Elution auch entweder durch inaktiviertes Serum oder durch Komplementlösung ausgeübt werden, da das Serum bekanntlicher Weise schwach alkalisch reagiert, und sein Eiweis in der Tat als Puffer fungieren kann.

Das oben erwähnte Hämolysintonerdeadsorbat wurde mit dem Gemisch von 1 ccm inaktiviertem Komplement + 19 ccm 1/7 M NaCl wie oben geschüttelt. Die von der Tonerde abentrifugierte Lösung zeigte sich als hämolysinhaltig.

Verdünnungsgrad	1	1/2	1/4	1/8	1/16
Hämolysen	++	+	+	+	+

Die Ausbeute des Antikörpers ist etwas weniger als bei der Elution mit Phosphat, doch sicher vorhanden. Der Hämolysenversuch ohne Komplement als Kontrolle war natürlich negativ.

Das Tonerdeadsorbat wurde dann wieder mit dem Gemisch von 1 ccm Komplement + 19 ccm 1/7 M NaCl eluiert. Das Elut wirkt nun hämolytisch ohne Zusatz des Komplements.

Verdünnungsgrad	1	1/2	1/4	1/8	1/16
Hämolysen	++	+	+	+	+

Dieser Versuch hängt mit dem später bei der Adsorption des Komplements zu erwähnenden insofern zusammen, als das

Komplement bei alkalischer Reaktion von der Tonerde nicht adsorbiert wird.

Es braucht vielleicht nicht angegeben zu werden, dass wir das adsorbierte Hämolysin mit $1/7$ Mol NaCl allein nicht aus Tonerde eluieren konnten.

Wir möchten hier nur über die Reversibilität der Adsorption Bericht erstatten, wagen es aber nicht, aus dem Resultat irgendeine Annahme über seine chemische Natur auszusprechen.

Die Ergebnisse bei dem Hämolysin sollen nun auf das Komplement erweitert werden.

Das Wesen der Komplementwirkung ist heute noch im Dunkeln, obwohl einige Erklärungen schon angegeben worden sind. Wir behalten uns eine diesbezügliche Auseinandersetzung bis zu der nächsten Mitteilung vor und beschränken uns hier darauf, nur die Ergebnisse der reversiblen Adsorption dieses rätselhaften Faktors des hämolytischen Systems anzugeben.

Versuch 7.

Adsorption des Komplements an Kaolin bei Phosphatpuffer.

Komplement	1 cem	37°C 1 St.	Überstehende Flüssigkeit	15 cem
I+II Phosphat	2 cem		Alkalilösung (P) + $1/7$ M NaCl	2 cem
$1/7$ NaCl	17 cem		auf Komplement untersucht . . .	17 cem
Kaolin	1 g			(+)

Phosphat I:II	Verdünnungsgrad				
	1	1/2	1/4	1/8	1/16
2:0	+++	+++	++	++	++
1.6:0.4	+++	++	+	+	+
1.2:0.8	+++	++	+	+	+
1:1	+++	++	++	+	+
0.8:1.2	++	++	++	+	+
0.4:1.6	—	—	—	—	—
0:2	--	—	—	—	—

Versuch 8.

Adsorption des Komplements an Tonerde bei Phosphatpuffer.

Komplement	1 ccm	37°C 1 St.	Überstehende Flüssigkeit	15 ccm
1/7 M NaCl	7 ccm		Alkalilösung (P)+1/7 M NaCl	2 ccm
I+II Phosphat	2 ccm		auf Komplement untersucht... 17 ccm (+)	
Tonerde	10 ccm			

Phosphat I:II	Verdünnungsgrad				
	1	1/2	1/4	1/8	1/16
2:0	—	—	—	—	—
1.6:0.4	—	—	—	—	—
1.2:0.8	—	—	—	—	—
1:1	—	—	—	—	—
0.8:1.2	—	—	—	—	—
0.4:1.6	±	—	—	—	—
0:2	+++	++	+	+	+

Diese Resultate zeigen, dass das Komplement in schwach alkalischer Reaktion von Kaolin, dagegen aus schwach saurem Medium von Tonerde adsorbiert wird, oder, richtiger gesprochen, adsorbiert zu werden scheint, solange, bis man mit der Reversibilität ins Klare kommt.

Versuch 9.

Umkehrbare Adsorption wurde bei Hämolyisin schön verwirklicht. Experimente mit Komplement trafen dagegen auf einige Schwierigkeiten.

Wie erwähnt, wird das Komplement von Kaolin aus der sekundären Phosphatlösung mitgerissen. Dieses Kaolinadsorbat konnte bei Behandlung mit primärer Phosphatlösung kein Komplement abgeben; d. h. das wie üblich isotonisch neutralisierte Elut zeigte keine komplettierende Wirkung. Das Komplement kann aber bekanntlich in Albumin- und Globulinfraction gespalten werden, in jeder Fraction die sogen. 3te Komponente enthaltend. Ob man in beiden Fractionen je eine eigentümlich wirkende Substanz, wie Endstück und Mittelstück, annehmen darf, ist eine Frage, worüber die Meinungen geteilt sind. Aber was wir bei der Adsorption und Elution des Komplements beachten müssen, ist diese Nichteinheitlichkeit des Komplements.

Wenn wir auch seine Elution nicht ausführen konnten, so könnte das doch wohl nur dadurch vorgetäuscht worden sein, dass irgend eine Komponente bei dem Adsorptionsversuch in der Restlösung zurück geblieben war.

Diese Annahme wurde aber nicht bestätigt, da die Mischung der Adsorptionsrestlösung und der eluierten Lösung auch keine komplettierende Wirkung ausübte. Der andere Elutionsversuch aus dem Kaolinadsorbat mittels des Gemisches von inaktiviertem Meerschweinchenserum + I Phosphat fiel auch negativ aus.

Im Gegensatz zu Hämolysin kann die Adsorption des Komplements an Kaolin nicht einfach in dem Sinne der Reversibilität verwirklicht werden.

Versuch 10.

Als wir aber den Tonerdebodensatz, welcher wie beim Versuch 8 durch Behandlung mit Komplement in schwach saurem Medium erhalten wurde, mit dem Gemisch von sekundärem Phosphat + inaktiviertem Meerschweinchenserum schüttelten, zeigte das Elut eine deutliche komplettierende Kraft.

Adsorption		Elution			
Komplement	1 ccm	} 1 St. bei 37°C Zentrifugation	{ abzentrifugierter Bodensatz		1 Stunde
I Phosphat	2 ccm		1/7 M NaCl	17 ccm	Schüttelung
Tonerde	17 ccm		II Phosphat	2 ccm	Zentrifuga- tion
			inakt. Komplement	1 ccm	
(+)					
auf Komplement untersucht 20 ccm					

Verdünnungsgrad	1	1/2	1/4	1/8	1/16
Hämolyse	++	+	+	+	+

Die Kontrollversuche waren alle negativ.

Keine Komplementwirkung konnte dagegen in dem Elut nachgewiesen werden, das entweder mittels 19 ccm 1/7 M NaCl + 1 ccm inaktiviertes Serums oder mittels 18 ccm 1/7 M NaCl + 2 ccm II Phosphats gewonnen wurde. Das Ergebnis war also, dass das Komplement nur in dem Elut vorhanden war, wenn das Tonerdeadsorbat unter Anwesenheit sowohl des inaktivierten

Serums als auch des II Phosphates geschüttelt wurde. Keins von beiden durfte dabei fehlen.

Eine Erklärung dieses Resultats mag damit gegeben werden, dass die Elution aus Tonerde ausser Aciditätsveränderung noch das Vorhandensein von kolloidalem Serumeiweiss bedarf. Oder das inaktivierte Serum könnte nur so daran teilgenommen haben, dass es einfach die sogen. 3te Komponente zuführte und an sich selbst mit dem eigentlichen Elutionsprocess nicht zu tun hatte.

Die Entscheidung wurde durch den nächsten Versuch gegeben.

Versuch 11.

Tonerdebodensatz wurde wie beim Versuch 10 hergestellt und mit 18 ccm $1/7$ M NaCl + 2 ccm II Phosphat 1 Stunde geschüttelt, und stark zentrifugiert. Die überstehende Lösung wurde wie üblich in geometrischer Reihe verdünnt und 1 ccm Verdünnung wurde mit 1 ccm inaktiviertem Serum (10%) + 1 ccm 5% Blutzellensuspension + 1 ccm Hämolyisin (3 Einheiten) vermischt.

Verdünnungsgrad	1	1/2	1/4	1/8	1/16
Hämolyse	++	+	+	+	+

Die Kontrollen waren negativ.

Das Resultat muss folgendermassen gedeutet werden. Mittelstück und Endstück können aus der Tonerde durch eine schwache Alkalizität eluiert werden. Aber zur Vervollständigung der komplettierenden Wirkung bedürfen sie noch einer 3ten Komponente, deren Zufuhr jedoch bei diesem Versuch durch inaktiviertes Serum erzielt wurde.

Versuch 12.

Es bleibt nun noch eine Frage übrig, ob nämlich die 3te Komponente vorher von der Tonerde wirklich aber irreversibel

adsorbiert wurde, oder in der Adsorptionsrestlösung unadsorbiert zurückgeblieben war. Die Entscheidung konnte darin gefunden werden, dass das Gemisch der Adsorptionsrestlösung und des später bekommenen Elutes experimentell keine Wirkung des Komplements zeigte.

Die Adsorption der 3ten Komponente ist also irreversibel.

Wir haben damit das Verhalten des Komplements bei der reversiblen Adsorption klar gestellt und es gelang uns jetzt, die Komplementlösung ohne 3te Komponente herzustellen.

Nach der Angabe von Cruickshank und Mackie (1912) wirkt die Albuminfraktion, welche nach vorherigem Zusatz von Lezithin zu Serum nach Liefmann erhalten wird, wie eine Komplementlösung. Die Albuminfraktion, wenn sie umgekehrt erst nach der Fraktionierung mit Lezithin zugesetzt wird, ist mit keiner Mittelstückwirkung versehen. Diese Angabe wurde nachgeprüft und bestätigt.

Lezithin wurde nach Levene (1927) aus Eigelb hergestellt. Man versetzt 1 ccm Meerschweinchenserum mit 1 ccm 0.1% wässriger Lezithinlösung und 3 ccm Wasser und leitet CO₂ 15 Minuten lang hindurch. Die erhaltenen beiden Fraktionen wurden, je auf 10 ccm isotonisch und dann weiter wie sonst in geometrischer Reihe verdünnt, auf die komplettierende Wirkung untersucht.

Verdünnungsgrad	1	1/2	1/4	1/8	1/16
Lezithinalbuminfraktion	++	++	++	+	+
„ globulinfraktion	—	—	—	—	—

Alle Kontrollversuche waren negativ. Wir haben ausserdem die Albumin- oder Globulinfraktion, die nach Liefmann aus dem einfach verdünnten Meerschweinchenserum gewonnen wurde, in geometrischer Reihe wieder verdünnt und jede mit 1 ccm 0.5% Lezithin in physiologischer Kochsalzlösung versetzt und auf die komplettierende Wirkung geprüft. Die Resultate

waren negativ. Es muss also angenommen werden, dass das sog. Mittelstück durch vorherigen Zusatz von Lezithin nun die Fällbarkeit mit Globulin verliert und in die Albuminfraktion übergeführt wird.

Solche Wirkung von Lezithin kann auch durch Ölsäureester des Cholesterins (0.5%), Ölsäure (0.3%) oder Cholesterin (0.5%) ersetzt werden und zwar in gleichem Betrag.

Cholesterinester wurde nach Hürthle (1895) künstlich dargestellt. Ölsäure (Merck) und Cholesterin (Kahlbaum) standen zur Verfügung. Die Suspension dieser Lipide wurde so gehandhabt dass die abgewogene Menge, in kleiner Menge von Amylalkohol gelöst, unter Schütteln in Wasser oder in physiologische Kochsalzlösung, je nach dem Falle, eingegossen wurde; beide Flüssigkeiten waren bei 80°C auf dem Wasserbad vorerwärmt.

Kontrollversuche wurden selbstverständlich genau ausgeführt und mit Sicherheit als negativ erwiesen.

Versuch 13.

Wenn eine so erhaltene Lipide-Albuminfraktion wie das Meerschweinchenserum mit Tonerde behandelt und danach bei Anwesenheit des inaktivierten Serums eluiert wurde, erhielt man eine komplettierende Wirkung in dem Elut. Wir geben hier ein Beispiel bei Lezithinalbuminfraktion an.

Lezithin-			$\left. \begin{array}{l} \text{Bodensatz} \\ \text{inaktiviertes 1 ccm} \\ \text{Serum} \\ \text{II Phosphat 2 ccm} \\ \text{1/7 M NaCl 17 ccm} \end{array} \right\} \begin{array}{l} \text{1 Stunde} \\ \text{Schüttelung,} \\ \text{dann} \\ \text{Zentrifugation} \end{array}$
Albuminfraktion 6 ccm	37°C,		
Tonerde 12 ccm	1 Stunde dann		
1 Phosphat 2 ccm	Zentrifugation		

Die überstehende Flüssigkeit wurde als Komplementlösung in verschiedenen Verdünnungen zum Experiment wie früher gebraucht.

Verdünnungsgrad	1	1/2	1/4	1/8	1/16
Hämolyse	++	+	+	+	+

Kontrollversuche waren negativ.

Die Lipid-Albuminfraktion verhält sich also auch bei der Adsorption und Elution genau so, wie das Komplement.

LITERATUR.

Cruickshank, J. u. Mackie, T. J. (1912): Bioch. Zs. **42**, 414.

Hürthle, K. (1895): Zs. f. physiol. chem. **21**, 340.

Levene, P. A. (1927): Jl. of Biol. chem. **72**, 587.

Willstätter, R. u. Kraut, H. (1923): Berichte d. dtsh. chem. Ges. **56**, 1117.

ÜBER DIE SPEZIFISCHE HÄMOLYSE.

II. Fermente in dem Meerschweinchenserum.

VON

KEIICHI HORINO.

(Aus dem medizinisch-chemischen Institut der medizinischen Akademie zu Chiba. Direktor: Prof. S. Akamatsu.)

(Eingegangen am 9. Juni 1928)

Es ist schon bekannt, dass die spezifische Hämolyse durch die Mitwirkung der zwei Komponenten, des spezifischen Hämolysins und des Komplements, herbeigeführt wird. Aber wie der Immunkörper und das Komplement an der Auflösung der Blutzellen teilnehmen, war der Gegenstand vieler hypothetischen Erörterungen.

Abgesehen von der Frage über die Spezifität, stimmen die Autoren darin überein, dass das Hämolysin auf die Erythrocyten so wirkt, dass das Komplement nun auf sie zu wirken vermag. Über den Wirkungsmechanismus des Komplements sind 2 verschiedene Anschauungen vorhanden: nämlich die Fermenttheorie und die kolloidchemische Theorie.

Seitdem Ehrlich und Morgenroth (1899) Komplement als eine fermentähnlich wirkende Substanz betrachteten, wurden viele Arbeiten über den Zusammenhang des Komplements mit Fermenten, besonders mit Protease und Lipase, veröffentlicht. Die lipolytische Theorie der Immunhämolyse nimmt ihren Ausgangspunkt aus den Arbeiten von Neuberg (1908) und Bull (1912). Olsen und Goette (1920) fanden dann eine weitgehende Analogie zwischen der Serumbutylase und dem Komplementendstück. Dieses Ergebnis wurde später von Baba (1926) bestätigt und noch erweitert. Brinkmann und Szent-Görgyi (1924) haben aber gegen die Annahme von Olsen und Goette gesprochen, weil sie keine Zunahme von titrierbarer Säure bei der spezifischen Hämolyse und auch keine Verminde-

rung von der Serumbutylase nach der Komplementablenkung konstatieren konnten. Die Annahme eines Zusammenhanges zwischen Hämolyse und Proteolyse wurde von Nolf (1908), Gruber (1901) und Ohta (1913) angegriffen. Aber selbst diese Autoren scheinen die Möglichkeit nicht auszuschliessen, dass die Proteolyse dabei zu gering sei, um chemisch an der Hand nachgewiesen zu werden. Solche Möglichkeit mag auch bei der lipolytischen Hypothese vorhanden sein.

Jedenfalls steht die Fermenttheorie auf der Annahme, dass die Erythrocytenstromata aus Lipoideiweissbindung zusammengesetzt sind. In diesem Punkt stimmt die kolloidchemische Auffassung mit der Fermenttheorie überein. Aber die Anhänger jener Auffassung legen den Schwerpunkt auf den physikalisch-chemischen Zustand des Serumeiweisses und schreiben die Komplementinaktivierung der Veränderung des Dispersitätsgrades des Eiweisses zu.

Nach dieser Theorie ist die Ursache der Hämolyse nichts anderes als die gegenseitige Fällung der entgegengesetzt geladenen Kolloiden. Aber es scheint mir nicht treffend wenn man sich nur auf unsere kolloidchemischen Kenntnisse des Eiweisses und Lipoids beschränkt, ohne nach einer chemischen Veränderung zu suchen.

Klopstock (1924) nahm das Verhältniss zwischen dem Hämolsin und dem Komplement wie das bei einem Proferment und seinem Aktivator an und wollte die aktivierende Wirkung des Komplements an die Unversehrtheit des kolloidalen Systems des Serumeiweisses knüpfen.

Sachs (1927) schrieb die Komplementwirkung der Labilität des Serumglobulins zu. Nach ihm soll die sogenannte Mittelstückfunktion mehr auf einen Zustand als auf einen bestimmten Stoff zurückzuführen sein. Wenn man sich die oben erwähnten verschiedenen Auffassungen überlegt, scheint es doch dringend nötig, einen Schritt weiter in die Analyse der Komplementwirkung zu tun, und diese Idee hat mich zu der Untersuchung über die Fermente im Meerchweinchenserum veranlasst.

Von der Annahme ausgehend, dass der Hämoglobinaustritt an den Abbau der kolloidalen Struktur der Blutzellen geknüpft ist, beschränkte sich mein Experiment nun auf die Fermente, welche an der Hydrolyse der höhernmolekularen Substrate teilnehmen. Wie bekannt, wird aber die komplettierende Wirkung des Serums erst dann vollständig, wenn seine beide Fraktionen zusammengebracht werden. Die Auffassungen, welche nur von dem Ferment im Serum oder in der Albuminfraktion oder von dem kolloidalen Zustand des Globulins sprechen, sind also nicht hinreichend, um diese notwendige Zusammenwirkung aufzuklären. Darum habe ich besonders darauf geachtet die Verteilung der Fermente in der Albumin- und Globulinfraktion zu untersuchen.

Das Experiment ergab, dass die im Meerschweinchenserum nachgewiesenen Fermente, nämlich Protease, Peptase, Butylase, Lipase, Lezithase, Amylase und Nuklease ausschliesslich in der Albuminfraktion vorhanden sind. Aber merkwürdigerweise findet sich das Thrombin reichlich in der Globulinfraktion, dagegen nur spärlich in dem Albuminanteil. Es war mir von grossem Interesse, dass das Ferment, nachdem alle anderen untersuchten enzymatischen Wirkungen nur in der Albuminfraktion begrenzt gefunden worden waren, in der anderen Fraktion nachzuweisen war, und veranlasste mich zu der Untersuchung über das Verhältnis des Thrombins mit der sog. Mittelstückfunktion.

Ich habe zuerst Thrombinlösung aus Ziegenblutserum nach Schmidt hergestellt und sah, dass diese Fermentlösung die Mittelstückfunktion ausschliesslich und zwar vollständig ersetzen kann. Wie in der vorigen Mitteilung angegeben wurde, wirkt die Albuminfraktion, die aus der mit Lezithin zugesetzten Komplementlösung fraktioniert erhalten wurde, ebenso komplettierend wie das native Serum. Das Adsorptions- und Elutionsverhalten dieser Lezithin-Albuminfraktion war dasselbe wie des nativen Komplements. Ich fand nun in so behandelter Albuminfraktion das Thrombin in reichlicher Menge, dagegen

nur wenig in der gleichbehandelten Globulinfraktion. Durch Lezithinvorbehandlung wird also die Verteilung des Thrombins parallel mit dem Mittelstück verändert.

Dass die Mittelstück- und Thrombinwirkung in der sog. Lezithinalbuminfraktion vorhanden ist, kann nicht anders gedeutet werden, als dass die mit diesen Wirkungen behaftete Substanz durch Lezithinzusatz in so einen Zustand übergeführt wird, wo sie nicht mehr von Kohlensäure gefällt werden kann. Dieser Annahme folgt also die Prüfung, ob das Mittelstück oder das Thrombin dadurch erhalten werden könne, dass man der vorher getrennten Globulinfraktion Lezithin zusetzt und daraus wieder das durch Kohlensäure fällbare Globulin (also die sog. Lezithinglobulinfraktion) abtrennt. Der Versuch bestätigte diese Vermutung. Wir haben schon einerseits gesehen, dass die Thrombinlösung die Wirkung des Mittelstücks vertreten kann, und sehen nun andererseits, dass die mittelstückenthaltende Lösung, so weit untersucht, die Thrombinwirkung ausüben kann.

Das Thrombin wurde wie das Komplement durch Erhitzen 30 Minuten lang bei 56°C inaktiviert.

Es wurde im vorliegenden Experiment klargestellt, dass die komplettierende Substanz, welche durch verschiedene Methoden hergestellt wurde, immer das Thrombin enthält und das Mittelstück und das Thrombin unter verschiedenen Bedingungen sich parallel verhalten. Wir sind nun in der Lage, in der Globulinfraktion des Komplements das Dasein einer Substanz zu bestätigen, die an der Hämolyse als sog. Mittelstück teilnimmt und bei der Blutgerinnung als Thrombin wirkt. Die Aktivität dieser Substanz könnte ja, wie es bei Fermenten der Fall ist, von ihrem physikalischchemischen Zustande abhängig sein. Aber das Wesentliche ist die Wirkung dieses Stoffes und nicht der Zustand des Stoffes oder des ihn tragenden Mediums.

EXPERIMENTELLER TEIL

1. Als Komplement diente Meerschweinchenserum.

2. Die auf das 10 fache mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnte Lösung wird in den Protokollen einfach als Komplementlösung angegeben.

3. Die Fraktionierung wurde nach Liefmann durch CO₂-Leitung ausgeführt, und die beiden Fraktionen wurden, nach allgemeinen Verfahren isotonisch verdünnt, als 10% Lösung gebraucht.

4. Komplementinaktivierung wurde durch Erhitzung 30 Minuten lang bei 56°C erzielt.

5. Die Beschreibung der einzelnen Untersuchungsmethoden, die wir gebrauchten, findet man in den Büchern, z. B. Rona: Fermentmethode.

Versuch 1 (Butylase).

Stalagometrische Bestimmung nach Rona und Michaelis.

gesättigte wässrige Tributylinlösung	50 ccm	} 37°C
M/3 Phosphatgemisch (1:7)	2 ccm	
zu untersuchende Lösung	2 ccm	

Wasserwert der Tropfpipette = 89 Tropfen

Gesättigte Tributylinlösung ergab 129 Tropfen

Tropfenzahl	sofort	nach 1 Std.	Differenz
10% Komplement	121	92	29
" Albuminfraktion	121	93	28
" Globulinfraktion	126	126	0
" inakt. Serum	126	120	6

Tropfenzahl	sofort	nach 1 Std.	nach 2 Stdn.	Differenz
2 % Komplement	124	101	98	26
" Albuminfraktion	128	109	106	23
" Globulinfraktion	126	126	126	0
" inakt. Serum	128	123	127	1

Versuch 2 (Trypsin).

Substrat ist Kongorot-Eiweisskoagula. Hitzkoaguliertes Serumeiweiss wird zwischen Filterpapier gepresst und im Mörser

fein gerieben. Die breiige Masse lässt man nun 24 Stunden in reichlich bemessener wässriger Kongorotlösung (5%) und die Färbung wird durch Erhitzen auf 60°C 30 Minuten lang fixiert. Sie wird dann mit Wasser wiederholt bis zum Farbloswerden des Waschwassers gewaschen und durch Behandlung mit Alkohol und Äther getrocknet. Das Pulver gibt, im Wasser aufgeschwemmt, bei 37°C nach 2 Stunden keine Färbung des umgebenden Mediums.

Aus jeder zu untersuchenden Fraktion (10%) wurde eine geometrische Reihe mit dem Quotienten 2 hergestellt, und 2ccm davon wurde mit einer kleinen Menge von gefärbten Eiweisskoagula versetzt und im Brutschrank bei 37°C 2 Stunden gehalten. Übergang des Farbstoffes in die Flüssigkeit wird als + angegeben.

Verdünnungsgrad	1	1/2	1/4	1/8	1/16
Komplement	+	+	+	+	+
Albuminfraktion	+	+	+	+	+
Globulinfraktion	—	—	—	—	—

Versuch 3 (Peptase).

1 g Wittepepton wurde in 100 ccm physiologischer Kochsalzlösung gelöst. Jeder Ansatz besteht aus gleichem Volum Peptonlösung und 10% iger Lösung der Fraktionen und wurde im Brutschrank von 37°C, mit Toluol überschichtet, angestellt. Die Verdauung wurde in den zeitweise herauspipettierten ccm nach alkoholischer Titrationsmethode von Willstätter und Walschmidt-Leitz mit 90 proz. alkoholischer 0.2-N-Kalilauge verfolgt.

Zeit	sofort	nach 5 Stdn.	nach 45 Stdn.
Komplement	0.30	0.50	0.91
Albuminfraktion	0.20	0.47	0.87
Globulinfraktion	0.15	0.23	0.27

Versuch 4 (Nuclease).

Untersuchungsmethode nach Pighini.

1,60 g Nucleinsäure (Merck) in 100 ccm 1/7-M-NaCl gelöst und mit 12 Tropfen Ammoniak zugesetzt. 2 ccm von jeder 10% igen Fraktionlösung kamen dazu. Temperatur: 37°C. Die Drehungsveränderung wurde in einem 2 dm Rohr mit Landolts Apparat verfolgt.

Zeit	sofort	nach 2 Std.	nach 4 Std.
Komplement	+3.03	+2.42	+2.26
Albuminfraktion	+3.02	+2.62	+2.32
Globulinfraktion	+3.02	+3.04	+3.06

Als Substratlösung diente auch 1,60% Natriumnucleat (Merck) in physiologischer Kochsalzlösung.

Zeit	sofort	nach 2 Stdn.	nach 4 Stdn.
Komplement	+3.12	+2.52	+2.30
Albuminfraktion	+3.15	+2.56	+2.35
Globulinfraktion	+3.13	+3.15	+3.11

Versuch 5 (Amylase).

Bestimmungsmethode nach Wohlgemuth.

5 ccm 1% iger Stärkelösung wurde mit 2 ccm verdünnter Lösung von jeder Fraktion versetzt. Nach 24 stündigem Stehen

unter Toluol bei 37°C wurde die Dextrinbildung durch Zusatz von Jodlösung geprüft. In der Tabelle bedeutet + Abbau bis zur Nichtverfärbung, ± bis zu blauroter Farbe und unveränderte blaue Verfärbung.

Verdünnungsgrad	1	1/2	1/4	1/8	1/16
Komplement	+	+	+	+	±
Albuminfraktion	+	+	+	+	±
Globulinfraktion	-	-	-	-	-

Versuch 6 (Lezithase und Cholesterinesterase).

Lezithin wurde nach Levene (1927) aus Eigelb dargestellt. Seine 0.5% ige Suspension in physiologischer Kochsalzlösung diente zur Untersuchung. Jede Versuchsreihe bestand aus 5ccm der Suspension, 1 ccm Phosphatgemisch (0.4 ccm $1/7$ M KH_2PO_4 + 0.6 ccm $1/7 \times 4/5$ M K_2HPO_4) und 5 ccm der 10% igen Lösung von jeder Fraktion. Aciditätszunahme wurde, nach Zusatz mit 11 ccm Alkohol, mit 50 proz. alkoholischer 0.1 N Kalilauge gegen Phenolphthalein titriert.

Zeit	sofort	nach 18 Stdn.	nach 42 Stdn.
Komplement	0,20 ccm	0,25 ccm	0,29 ccm
Albuminfraktion	0,20 ccm	0,25 ccm	0,30 ccm
Globulinfraktion	0,12 ccm	0,16 ccm	0,16 ccm

Die lezithinspaltende Wirkung des Serums ist sehr schwach, aber die Wirkung scheint noch in der Albuminfraktion vorhanden zu sein.

Cholesterinester wurde nach Hürthle (1895) dargestellt. 0.5 g Cholesterinester wurden in kleiner Menge von Amylalkohol gelöst und unter Umrühren in die auf 80°C vorerwärmte 100 ccm physiologische Kochsalzlösung eingegossen. Diese Suspen-

sion diene in derselben Weise wie bei dem Lezithasenversuch als Substrat.

Zeit	sofort	nach 18 Stdn.	nach 42 Stdn.
Komplement	0.13 ccm	0.16 ccm	0.17 ccm
Albuminfraktion	0.12 ccm	0.16 ccm	0.17 ccm
Globulinfraktion	0.07 ccm	0.09 ccm	0.09 ccm

Die Wirkung des Serums selbst ist zu klein, um etwas darüber zu sagen. Soweit wir bisher Meerschweinchen Serum untersucht haben, scheinen die Fermente ausschliesslich in der Albuminfraktion vorzukommen.

Versuch 7 (Thrombin).

Fibrinogenlösung wurde aus Oxalatplasma der Ziegen durch Fällung mit gleichem Volum der gesättigten Kochsalzlösung und Wiederauflösung in physiologischer Kochsalzlösung hergestellt. 1 ccm davon wurde mit gleichem Volum der verschieden verdünnten Lösung von den zu untersuchenden Fraktionen beigemischt, und das Resultat wurde nach zweistündiger Anstellung bei 37°C nachgesehen.

Verdünnungsgrad	1	1/2	1/4	1/8	1/16
Komplement	+++	+++	+++	+++	+++
Albuminfraktion	—	—	—	—	—
Globulinfraktion	++	++	++	++	++

Wenn die Reagenzgläser der Albuminfraktion noch bis zum nächsten Morgen in den Eisschrank gestellt werden, tritt darin die Gerinnung auf. Jedenfalls ist ihr Thrombingehalt als sehr gering zu schätzen.

Versuch 8.

Thrombinlösung wurde aus dem Ziegenserum, das durch

spontane Gerinnung gewonnen wurde, nach Schmidt hergestellt und das dabei mittels der physiologischen Kochsalzlösung erhaltene Extrakt diente bei dem vorliegenden Versuche als Thrombinlösung. Diese Lösung war stark effektiv bei der Fibrinogengerinnung und wirkte ausserdem wie das Mittelstück. 1 ccm der isotonisch verdünnten Thrombinlösung erzeugte zusammen mit 1 ccm Hämolyisin (3 Einheiten), 1 ccm 10% Albuminfraction und 1 ccm 5% Blutzellensuspension eine starke Hämolyse. Die Kontrollversuche waren alle negativ.

Verdünnungsgrad	1	1/2	1/4	1/8	1/16
Hämolyse	++	++	++	++	++

Versuch 9.

Lezithinalbumin- und Lezithinglobulinfraktion wurde wie bei dem Versuch in der vorigen Mitteilung nach Cruickshank und Mackie hergestellt.

Der Thrombingehalt in diesen Fraktionen wurde mit dem der in üblicher Weise hergestellten beiden Fraktionen verglichen. Jede Fraktion wurde isotonisch in geometrischer Reihe verdünnt, und 1 ccm davon wurde mit gleichem Volum von $MgSO_4$ -Plasma (Wohlgemuth) zugesetzt. Nach 2 Stunden im Brutschrank wurden sie bis zu dem nächsten Morgen in den Eisschrank gestellt. Das Resultat war wie folgt.

Verdünnungsgrad	1	1/2	1/4	1/8
Komplement	komplett	komplett	fast komplett	partiell
Albuminfraction	partiell	Spur	—	—
Globulinfraktion	fast komplett	partiell	Spur	Spur
Lezithinalbuminfraktion	komplett	fast komplett	partiell	Spur
Lezithinglobulinfraktion	partiell	Spur	—	—

Versuch 10.

Die Globulinfraktion, welche nach Liefmann aus 1 ccm Meerschweinchenserum gewonnen wurde, wurde in 1 ccm 1/7M NaCl gelöst, und mit 3 ccm destilliertem Wasser und 1 ccm 1% iger Lezithinlösung versetzt. Das Globulin wurde dann wieder durch Kohlensäure gefällt, und die überstehende Flüssigkeit, isotonisch auf 10 ccm verdünnt, diente als Mittelstücklösung zur Untersuchung. Versuchsanordnung war wie in voriger Mitteilung.

Verdünnungsgrad	1	1/2	1/4	1/8	1/16
Hämolyse	++	+	+	±	—

Kontrolle: Hämolysin + die vorliegende Lösung oder Hämolysin + Albuminfraktion wirkte nicht hämolytisch.

Als diese Lösung wieder mit dem gleichen Volum Fibrinogen gemischt wurde, war die Gerinnung nach 2 Stunden bei 37°C komplett.

LITERATUR.

- Baba, T. (1926): Mitteil. d. Med. Ges. zu Tokio, **14**, 257.
 Brinkmann, R. Szent-Györgyi, V. A. (1924): Bioch. Zs. **146**, 212
 Ehrlich, P. u. Morgenroth, J. (1899): Berl. Klin. Ws. 6,
 Gruber, M. (1901): Münch. Med. Ws. 1924.
 Horino, K. (1928): Jl. of Bioch. **9**, 407.
 Jobling, J.W. and Bull. (1912): Jl. of Exp. Med. **16**, 483.
 Klopstock, F. (1924): Dtsch. Med. Ws. 1171.
 Neuberg, C. (1908): Bioch. Zs. **11**, 400.
 Nolf, P. (1908): Diction. de phys. Paris.
 Ohta, K. (1913): Bioch. Zs. **46**, 247.
 Olsen, O. u. Goete, K. (1920): Bioch. Zs. **112**, 188.
 Sachs, H. (1927): Bioch. Zs. **180**, 288.

ÜBER DIE SPEZIFISCHE HÄMOLYSE.

III. Das Lysinogen der Erythrocyten und seine neue Reaktion.

VON

KEIICHI HORINO.

*(Aus dem medizinisch-chemischen Institut der Medizinischen
Akademie zu Chiba. Direktor: Prof. S. Akamatsu.)*

(Eingegangen am 9. Juni 1928)

In der vorigen Abhandlung haben wir mitgeteilt, dass das Thrombin in der Globulinfraktion vorhanden ist, entgegen den anderen Fermenten, die in der Albuminfraktion nachzuweisen sind, und darauf aufmerksam gemacht, dass das Verhalten des Thrombins und des Mittelstückes unter verschiedenen Bedingungen übereinstimmt.

Wir wissen von der Wirkung des Thrombins nichts weiteres, als dass das Fibrinogen dadurch in das Fibrin übergeführt wird. Aber ob die Reaktion, die sicher aus den stufenweise ablaufenden einzelnen Reaktionen besteht, auch auf ein anderes Substrat, das mit dem Fibrinogen irgendeine Verwandtschaft besitzt, ausgeübt werden kann, ist noch unbekannt, aber doch hypothetisch denkbar.

Unser Experiment wurde also zuerst auf die Ermittlung der fibrinogenartigen Substanz in den Erythrocyten gerichtet.

Als die ausgewaschenen Ziegenerythrocyten mit destilliertem Wasser hämolysiert und von den Stromata stark abzentrifugiert waren, zeigte die gewonnene ganz klare Flüssigkeit bei der Halbsättigung mit NaCl eine starke Trübung. Solche Trübung konnte auch durch CO₂-Leitung hervorgerufen werden.

Wir haben darum eine solche stromatafreie Flüssigkeit, wie folgt, hergestellt. Ein beliebiges Quantum des Ziegenblutes wurde durch Kaliumoxalat ungerinnbar gemacht und zentrifugiert. Die roten Blutkörperchen wurden 3 mal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen, und der am letzten gewonnene

Blutzellenbrei wurde mit Wasser auf das 10fache Volum des anfangs entnommenen Blutes verdünnt.

Nach der Abzentrifugierung der Stromata wurde das klare Hämolysat noch auf das doppelte mit $2/7\text{ M}$ NaCl nachgefüllt. Diese Blutlösung ist nun isotonisch und entspricht der 5% igen Erythrocytensuspension, die wir beim Hämolysenversuch zu gebrauchen gewöhnt sind.

Wir haben 1 ccm solcher Blutlösung mit je 1 ccm von dem verdünnten Hämolysin (3 Einheiten) und dem Komplement (1:10) versetzt und wie beim Hämolysenversuch 2 Stunden im Brutschrank und dann bis zum nächsten Morgen in den Eisschrank gestellt. Das Gemisch blieb klar, auch in dem Falle, wo es mit der Kochsalzlösung halbgesättigt wurde, blieb die Lösung ganz klar. Es braucht vielleicht nicht gesagt zu werden, dass das Gemisch vor der Anstellung im Brutschrank durch NaCl-Halbsättigung eine starke Trübung zeigte. In den als Kontrollen ausgeführten Versuchen mit alleinigem Zusatz von Hämolysin oder Komplement trübte sich die Lösung bei der Halbsättigung, wie es bei der unbehandelten Flüssigkeit der Fall war. Um jener Trübung vorzubeugen, genügte auch nicht der Zusatz von Hämolysin und Albuminfraktion oder Globulinfraktion des Komplements.

TABELLE I.

Nr.	1	2	3	4	5	6	7
Hämolysin	1 ccm	—	—	—	1 ccm	1 ccm	1 ccm
Komplement	—	1 ccm	—	—	1 ccm	—	—
Albuminfraktion	—	—	1 ccm	—	—	1 ccm	—
Globulinfraktion	—	—	—	1 ccm	—	—	1 ccm
die Blutlösung	1 ccm	1 ccm	1 ccm	1 ccm	1 ccm	1 ccm	1 ccm
Trübung	+	+	+	+	—	+	+

Als die Blutlösung aus den Kaninchenerythrocysten her-

gestellt wurde, wirkte das Gemisch des Hämolsins und des Komplements nicht darauf; d. h. eine starke Trübung entstand bei Kochsalzzusatz. Es handelt sich hier daher um eine Reaktion mit Spezifität.

TABELLE II.

Nr.	1	2	3	4	5	6	7
Hämolsin	1 cem	—	—	—	1 cem	1 cem	1 cem
Komplement	—	1 cem	—	—	1 cem	—	—
Albuminfraktion	—	—	1 cem	—	—	1 cem	—
Globulinfraktion	—	—	—	1 cem	—	—	1 cem
Kaninchen- Blutlösung	1 cem	1 cem	1 cem	1 cem	1 cem	1 cem	1 cem
Trübung	+	+	+	+	+	+	+

Da wir vorher erfahren hatten, dass die durch die NaCl-Halbsättigung oder die CO₂-Leitung fällbare fibrinogenartige Substanz nicht in destilliertem Wasser, wohl aber in physiologischer Kochsalzlösung löslich ist, haben wir die Lösung der Substanz frei von Hämoglobin, wie folgt, dargestellt.

Das stromatafreie Hämolsat aus den gewaschenen Ziegenblutzellen, die man wie früher gewann, wurde, ohne es isotonisch zu machen, mit Kohlensäure durchleitet, und der entstandene fein suspendierende Niederschlag wurde stark abzentrifugiert. Der Bodensatz wurde nun in kleiner Menge von 1/7 M NaCl gelöst und mit Wasser auf das 5fache verdünnt und wieder durch CO₂ gefällt. Durch Wiederholung des Processes konnte die Substanz fast farblos erhalten werden. Man löst sie in physiologischer Kochsalzlösung auf, und füllt das ursprüngliche Blutvolum mit derselben Salzlösung auf. Die Kochsalzlösung muss frei von Kalk sein, sonst wird die Ausbeute der fibrinogenartigen Substanz stark herabgesetzt. Diese Substanz in der Lösung ist fällbar durch Halbsättigung mit NaCl, aber nicht

durch den Zusatz mit dem Komplement oder seiner Globulinfraktion.

Als diese Lösung wieder mit Hämolsin und Komplement wie früher vorbehandelt wurde, zeigte das Gemisch keine Trübung bei der NaCl-Halbsättigung. Das Klarbleiben konnte nicht erreicht werden, wenn irgendein Komponent, nämlich Hämolsin, Albumin- oder Globulinfraktion des Komplements dabei fehlte.

TABELLE III.

Nr.	1	2	3	4	5	6	7
Hämolsin	1 cem	—	—	—	1 cem	1 cem	1 cem
Komplement	—	1 cem	—	—	1 cem	—	—
Albuminfraktion	—	—	1 cem	—	—	1 cem	—
Globulinfraktion	—	—	—	1 cem	—	—	1 cem
Fibrinogenartige Substanz	1 cem	1 cem	1 cem	1 cem	1 cem	1 cem	1 cem
Trübung	+	+	+	+	—	+	+

Jene Substanz aus den roten Blutkörperchen wurde durch die Mitwirkung des Hämolsins und des Komplements in einen solchen Zustand übergeführt, dass sie bei der NaCl-Halbsättigung nicht mehr ausfallen konnte. Das Resultat war also, kolloidchemisch betrachtet, eine Dispersitätssteigerung, und ein che-

TABELL IV.

Verdünnungsgrad des Elutes	1	1/2	1/4	1/8	1/16	Kontrolle
das Elut	1 cem	1 cem	1 cem	1 cem	1 cem	1 cem (unverdünnt)
1/7 M NaCl	—	—	—	—	—	1 cem
Hämolsin	1 cem	1 cem	1 cem	1 cem	1 cem	—
die Blutlösung	1 cem	1 cem	1 cem	1 cem	1 cem	1 cem
Trübung	—	—	—	—	—	+

mischer Abbau kann dabei angenommen werden. Derselbe Versuch konnte mit der durch Tonerdeadsorption und Elution bekommenen Komplementlösung ein positives Resultat erzielen.

In der vorigen Abhandlung haben wir gesehen, dass die sog. Lezithin-Albuminfraktion bei der spezifischen Hämolyse eine komplettierende Wirkung hat. Dies war auch der Fall bei dem Versuch mit der fibrinogenartigen Substanz. Die Lezithin-Albuminfraktion selbst ist nicht fällbar durch Halbsättigung mit NaCl.

TABELLE V.

Nr.	1	2	3	4
Lezithinalbuminfraktion	1 cem	—	1 cem	—
Lezithinglobulinfraktion	—	1 cem	—	1 cem
Hämolysin	—	—	1 cem	1 cem
Die Blutlösung	1 cem	1 cem	1 cem	1 cem
Trübung	+	+	—	+

Wir wissen nun nach der vorigen Mitteilung, dass die Thrombinlösung nach Schmidt bei der spezifischen Hämolyse die Globulinfraktion des Komplements vertreten kann. Bei dem Versuch mit der fibrinogenartigen Substanz war das auch der Fall.

TABELLE VI.

Nr.	1	2	3	4	5
1/7 M NaCl	—	1 cem	1 cem	1 cem	1 cem
Albuminfraktion	1 cem	1 cem	—	—	—
Globulinfraktion	—	—	1 cem	—	—
Thrombinlösung	1 cem	—	—	1 cem	—
Hämolysin	1 cem	1 cem	1 cem	1 cem	—
Fibrinogenartige Substanz	1 cem	1 cem	1 cem	1 cem	1 cem
Trübung	—	+	+	+	+

Als die fibrinogenartige Substanz aus den Erythrocyten von Kaninchen dargestellt wurde, war der Versuch mit unserem Hämolysin und Komplement negativ. Man sieht hier wieder die Spezifität der Reaktion.

TABELLE VII.

Nr.	1	2	3	4	5	6	7
Hämolysin	1 ccm	—	—	—	1 ccm	1 ccm	1 ccm
Komplement	—	1 ccm	—	—	1 ccm	—	—
Albuminfraktion	—	—	1 ccm	—	—	1 ccm	—
Globulinfraktion	—	—	—	1 ccm	—	—	1 ccm
Fibrinogenartige Substanz (Kaninchen)	1 ccm	1 ccm	1 ccm	1 ccm	1 ccm	1 ccm	1 ccm
Trübung	+	+	+	+	+	+	+

Wir müssen aber zunächst entscheiden, ob unsere fibrinogenartige Substanz mit dem Lysinogen der Erythrocyten irgendeinen Zusammenhang hat, sonst könnte unsere eben konstatierte Reaktion nur eine zufällige Erscheinung sein und hätte mit der spezifischen Hämolyse gar nichts zu tun.

Wir haben darum Kaninchen mit der fibrinogenartigen Substanz aus den gewaschenen Ziegenblutzellen immunisiert und zwar nach farcierter Methode bei der intravenösen Injektion von 2, 4, und 6 ccm mit 48stündigen Zeitintervallen.

Sieben Tage nach der letzten Injektion erfolgte die Blutentnahme. Das Immunserum wurde wie üblich eine halbe Stunde im Wasserbad bei 56°C erhitzt.

Dieses Immunserum wies einen hohen hämolytischen Titer (1:2000) und selbst in der Verdünnung von 1:40000 war noch eine mässige Hämolyse zu sehen. Gegen Hammelerythrocyten war es im gleichem Grade wirksam, gegen Rindererythrocyten aber schwach und gegen Kaninchenerythrocyten ohne Wirkung. Schweinerythrocyten wurden nur mit dem Immunserum von 1/50 Verdünnung ganz schwach hämolytisch. Dieses Ergebnis

zeigt entscheidend, dass unsere fibrinogenartige Substanz das Lysinogen der roten Blutzellen ist.

TABELLE VIII.

Verdünnungs- grad Blutarten	1/50	1/100	1/200	1/500	1/1000	1/2000	1/5000	1/10000	1/20000	1/40000	Kontrolle
Ziege	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	+	—
Hammel	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	+	—
Rind	+	+	+	+	±	—	—	—	—	—	—
Kanin hen	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Schwein	±	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Das Immunsérum besass ausserdem das Präzipitin gegen die antigene Substanz, aber keine agglutinierende Wirkung auf die Ziegenerythrocyten.

TABELLE IX.

Verdünnungsgrad	1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	Kontrolle
Sediment	+++	++	++	+	+	+	+	+	+	±	—

Es ist eine oft aufgeworfene Frage, ob an der Hämolyse und der Hämagglutination dasselbe Agens teilnimmt oder nicht. Unser Experiment ergab klar die Verschiedenheit des Hämoly-sins von dem Agglutinin.

Balls und Korns (1918) konnten ausschliesslich Häm-olysin bekommen durch die Injektion des Stromataextrakts mittels alkalischer physiologischer Kochsalzlösung. Wenn man dieses Resultat zusammen mit dem unseren in Betracht zieht, so kommt man zu dem Schluss, dass die lysinogene Substanz der Blutzellen sowohl in den Stromata als auch in der Zellen-flüssigkeit vorhanden ist. Es könnte aber sein, dass die Substanz an den Stromata locker verbunden ist und bei der Wasser-hämolyse mehr oder weniger in die Lösung übergeht. Jeden-falls ist das Hämoglobin in den Blutzellen auf Grund dieser lysinogenen Substanz vor dem Austritt verhindert enthalten.

Man hat schon gesehen, dass unser neues Immunsrum die lysinogene Substanz präcipitiert, aber das Ziegenblut ohne Komplement nicht auflöst. Es scheint also, wie die lysinogene Substanz, welche in der Zelle an der Festhaltung des Blutfarbstoffes teilnimmt, eine Veränderung zu erleiden, ohne Hämoglobinaustritt und Hämaggglutination herbeizuführen.

Diese Veränderung, welche das Immunsrum auf die lysinogene Substanz im Sitz ihrer strukturellen Anordnung ausübt, braucht aber nicht eine Präcipitation zu sein, die bei dem Versuch mit der isolierten Substanz erst durch die relativ grössere Menge von Immunsrum hervorgerufen wird. Die lysinogene Substanz wird ja von dem Immunsrum angegriffen, aber nicht unbedingt in solche umgewandelt, die unlöslich ist in physiologischer Kochsalzlösung. Das zeigte das folgende Experiment.

Der gewaschene Ziegenblutzellenbrei wurde mit 19 fachem Volum von Hämolysin(1:3000; 1 ccm = ca 3 Einheiten) in üblicher Weise sensibilisiert und dreimal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen. Der endlich bekommene Bodensatz wurde mit Wasser zugesetzt. Das Hämolysat wurde, nach der Befreiung von Stromata durch Zentrifugation, mit 2/7 M NaCl auf das Doppelte verdünnt. Diese klare Blutlösung konnte durch NaCl-halbsättigung trübe gemacht werden, aber als sie mit dem Komplement vorbehandelt wurde, blieb die Lösung klar, auch nach der Halbsättigung mit NaCl.

TABELLE X.

Nr.	1	2	3	4
1/7 M NaCl	1 ccm	—	—	—
Komplement	—	1 ccm	—	—
Albuminfraktion	—	—	1 ccm	—
Globulinfraktion	—	—	—	1 ccm
sensibilisierte Blutlösung	1 ccm	1 ccm	1 ccm	1 ccm
Trübung	+	—	+	—

Die sensibilisierte lysinogene Substanz kann also in der Zelle noch ungefällt bleiben. Wir haben ausserdem das Verhalten der normalen Ziegenerythrocyten gegen die Farbstoffe mit dem der sensibilisierten verglichen. Sensibilisation wurde, wie üblich, aber mit unserem neuen Immuns serum ohne Hämagglutinin ausgeführt. Im dem Resultat war kein Unterschied zu erkennen.

Jedenfalls ist eine Veränderung der lysinogenen Substanz in den Zellen durch Immuns serum zu erwarten. Da es sich hier um die Reaktion zwischen Kolloiden handelt, stellt sich die Adsorption selbstverständlich vor der chemischen Reaktion ein. Jene physikalische Reaktion ist jedoch nur eine vorbereitende, und in diesem Sinne ist das Hämolsin nicht der Vermittler der anschliessenden Komplementwirkung, sondern der erste Fechter der Hämolyse. Unter der Sensibilisation muss man also eine chemische Veränderung eines Bestandteiles der Blutzellen, der lysinogenen Substanz, verstehen. Man spricht ab und zu von der Reversibilität der Hämolsinbindung an den Blutzellen. Kosakai (1918) konnte den an den Blutzellen gebundenen Amboceptor durch Digerieren in Rohrzuckerlösung fast quantitativ wieder abspalten. Die Adsorption ist ja reversibel, aber die nach der Adsorption eingetretene chemische Veränderung ist nicht mehr umkehrbar.

Was die Wirkung des Komplements anbelangt, so ist ihr Wesen noch unklar, aber wenn es erlaubt ist, eine Hypothese aufzustellen, möchten wir eine Wirkung des Thrombins auf die schon angegriffene lysinogene Substanz annehmen. Unter der Thrombinwirkung verstehen wir aber nicht die Gerinnung des Fibrinogens, sondern die dabei sich abspielende chemische Reaktion, welche wohl bei ähnlichen Substraten zustande kommen kann. Nach dieser chemischen Veränderung ist die lysinogene Substanz nun in der Lage, von dem Ferment in der Albuminfraktion (vielleicht Tryptase und Peptase) weiter angegriffen zu werden.

Über die Natur unseres fibrinogenartigen Lysinogens wird

die Untersuchung fortgesetzt.

LITERATUR.

- Balls, A. K. and Korns, J. H. (1918): *Jl. of Immunol.* **3**, 375.
Horino K. (1928,i): *Jl. of Bioch.* **9**, 407.
Horino, K. (1928,ii): *Jl. of Bioch.* **9**, 421.
Kosakai, M. (1918): *Jl. of Immunol.* **3**, 109.
Németh, L. u. Kallós, P. (1927): *Protoplasma*, **3**, 11.
-

Bei der Korrektur habe ich die Arbeit von Bennet und Schmidt (*Jour. Immunol.* **4**, 29, 1919) in "The Chemical Pathology, 1925" zitiert gefunden. Diese Autoren konnten die lysinogene Substanz aus Ochsenerythrocyten erhalten und ihre Herstellungsmethode war zufällig prinzipiell fast übereinstimmend mit meiner. Da nichts von der Arbeit aus den Handbüchern nachgesehen werden konnte, wurde mein Experiment unabhängig davon ausgeführt. Wie man aus den vorliegenden Mitteilungen ersehen kann, war die Herstellung des Lysinogens ein Ergebnis, das bei den Experimenten und zwar am eigentlichen Ausgangspunkt derselben gewonnen wurde. Jedenfalls wird die Priorität hinsichtlich der Herstellungsmethode des Lysinogens jenen Autoren zugesprochen werden müssen.

BEDEUTUNG DER GALLENSÄURE IM KOHLEHYDRAT-
STOFFWECHSEL (VI). ÜBER DEN EINFLUSS DES
GALLENSÄUREVERLUSTES UND DER ÜBER-
SCHÜSSIGEN GALLENSÄUREZUFUHR AUF
DEN ADRENALINGEHALT DER
NEBENNIERE.

VON

TEIJI OKAMURA

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Okayama
Vorstand: Prof. Dr. T. Shimizu)

(Eingegangen am 11. Juni 1928.)

Durch den Versuch von Misaki (1927) ist bekannt, dass die subkutane Zufuhr von Cholsäure und Desoxycholsäure bei Kaninchen zu der Abnahme des Adrenalingehaltes der Nebenniere, zu dem Abfall des nüchternen und hyperglykämischen Blutzuckers und zu der Abnahme der Adrenalinglykosurie führt. Daraus hat Misaki geschlossen, dass die Gallensäure im Kohlehydratstoffwechsel dem Adrenalin entgegen wirkt.

Hinsichtlich der antagonistischen Wirkung der Gallensäure gegenüber Adrenalin hat Murakami (1928) gefunden, dass der hypoglykämische Zustand des einseitig nebennierenlosen Kaninchens durch die Vermehrung der antagonistisch wirkenden Gallensäure bedingt ist. Weiter hat er (1928) aus seinem Experiment geschlossen, dass die Blutdrucksenkung bei dem Gallensäureverlust aus dem Organismus, z. B. bei Ableitung der Galle nach aussen, durch die Vermehrung des Adrenalins im Blut und die Blutdrucksenkung bei überschüssiger Zufuhr der Gallensäure, z. B. bei Stauungsikterus oder bei peroraler Zufuhr der Gallensäure, durch die Verminderung des Adrenalins im Blut bedingt würde, welches gegen die Gallensäure antagonistisch wirkt und die Adrenalinsekretion der Nebenniere hemmt.

In einer früheren Mitteilung habe ich (1928) berichtet, dass die experimentelle Ableitung der Galle nach aussen durch die Gallenblasenfistel mit der Zeit eine allmählich sich steigende

Hyperglykämie hervorruft, welche durch die Zufuhr von Gallensäure wieder herabgesetzt wird, und der Blutzuckergehalt bei Stauungsikterus einen verminderten Wert zeigt. Aus diesen Daten habe ich geschlossen, dass der Gallensäureverlust aus dem Organismus eine Hyperglykämie und die überschüssige Zufuhr von Gallensäure in den Organismus eine Hypoglykämie herbeiführt, und dass auf diese Weise der Blutzuckergehalt durch die gegeneinander wirkenden Faktoren, Gallensäure und Adrenalin, immer auf einem konstanten Wert erhalten wird.

Es ist einerseits eine bekannte Tatsache, dass das Adrenalin in der Leber die Aufgabe hat, die Leber zum Abbau ihrer Glykogenbestände zu veranlassen. Andererseits ist von Misaki (1927) bewiesen, dass die Gallensäure, welche aus der Leber ausgeschieden wird, die Aufgabe hat, die Leber zur Ablagerung des Glykogens zu veranlassen.

Auf Grund oben erwähnter Tatsachen kann man wohl vermuten, dass die Hyperglykämie bei Gallensäureverlust durch die gesteigerte Sekretion des Adrenalins in der Nebenniere, welches das Glykogen in der Leber mobilisiert, und die Hypoglykämie bei überschüssiger Zufuhr der Gallensäure, die zur Ablagerung des Glykogens in der Leber führt, durch die verminderte Adrenalinsekretion der Nebenniere bedingt ist.

In diesem Sinne habe ich den Adrenalingehalt der Nebenniere von Kaninchen bei Ableitung der Galle nach aussen durch die Gallenblasenfistel, bei Stauungsikterus und bei peroraler Zufuhr von Gallensäure untersucht.

EXPERIMENTELLER TEIL.

1. *Einfluss des experimentellen Stauungsikterus auf den Adrenalingehalt der Nebenniere.*

Zum Versuch habe ich Kaninchen verwendet, die unter möglichst gleichen Bedingungen gezüchtet worden sind und möglichst gleiches Körpergewicht hatten. Zum Zweck des Stauungsikterus habe ich den Ductus Choledochus immer an zwei Stellen doppelt unterbunden. Am zweiten Tage nach der

TABELLE I. Versuch 1. (Bei Stauungsikterus)

Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	Durchschnittswert.
Körpergewicht (g.)	1820	1760	1630	1660	1500	1640	1590	1740	1620	1630	1750	1740	1480	1650	1570	1740	1370	1280	1920	1250	1562
Gewicht der Niere (g.)	0,375	0,250	0,185	0,420	0,318	0,336	0,245	0,303	0,253	0,290	0,351	0,230	0,210	0,373	0,258	0,221	0,235	0,139	0,291	0,163	0,272
Totales Adrenalin (mg.)	0,86	0,63	0,53	1,12	0,71	0,83	0,61	0,84	0,76	0,63	0,81	0,69	0,59	0,93	0,70	0,43	0,62	0,51	0,75	0,49	0,704
Adrenalin in 1g Nebenniere (mg.)	2,29	2,52	2,87	2,69	2,25	2,49	2,50	2,79	3,03	2,20	2,33	3,04	2,83	2,63	2,73	1,97	2,68	3,70	2,59	3,06	2,65

Versuch 2. (Bei Ableitung der Galle)

Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	Durchschnittswert.
Körpergewicht (g.)	1830	1950	1750	1770	1870	1730	1790	1930	1730	1640	1950	1830	1730	1750	1930	1845
Gewicht der Nebenniere (g.)	0,305	0,311	0,525	0,259	0,360	0,220	0,306	0,340	0,173	0,303	0,341	0,236	0,230	0,201	0,362	0,298
Totales Adrenalin (mg.)	1,22	1,17	1,19	0,85	1,08	0,91	0,97	0,80	0,71	0,68	1,08	1,02	0,82	0,89	1,06	0,957
Adrenalin in 1g Nebenniere (mg.)	4,02	3,78	2,11	3,32	3,00	4,18	3,20	2,36	4,13	2,26	3,18	4,36	3,58	4,45	2,93	3,39

Versuch 3. (Kontrolle)

Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	Durchschnittswert.
Körpergewicht (g.)	2360	2490	1720	1960	1820	1630	1620	1590	1680	1740	1680	1320	1810	1520	1250	1747
Gewicht der Nebenniere (g.)	0,730	0,718	0,316	0,513	0,356	0,311	0,285	0,143	0,321	0,360	0,336	0,222	0,361	0,201	0,158	0,355
Totales Adrenalin (mg.)	1,77	1,58	1,09	1,60	0,92	0,92	0,83	0,49	0,97	1,05	1,02	0,81	1,13	0,72	0,38	0,978
Adrenalin in 1g Nebenniere (mg.)	2,43	2,21	3,46	3,12	2,60	2,96	2,91	3,40	3,05	2,92	3,06	3,68	3,14	3,57	2,45	3,09

Operation wurden, erst als die Ausscheidung des ikterischen Harns begonnen hatte, die Tiere unter Verblutung zum Tode gebracht, dann wurde den Tieren die Nebenniere exstirpiert, und das Blut durch Betupfen mittelst Filtrierpapiers von der Nebenniere befreit. Diese Nebennieren wurden genau abgewogen und nach der von Kodama modifizierten Folin-Cannon-Denis'schen Methode (1912) wurde der Adrenalingehalt kolorimetrisch bestimmt. Als Kontrolle habe ich am 3. Tage nach der Operation, indem der Bauch einmal aufgeschnitten und wieder zugenäht wurde, den Adrenalingehalt der Nebenniere nach derselben Methode wie bei Stauungsikterus bestimmt.

Wie aus dem Versuch 1. der Tabelle I. ersichtlich ist, zeigt der Adrenalingehalt der Nebenniere eine ziemlich individuelle Schwankung. Der Adrenalingehalt in 1 g Nebenniere beträgt durchschnittlich 2,65 mg. Nach Misaki ist der Adrenalingehalt in 1 g Nebenniere bei der Zufuhr von Cholsäure und Desoxycholsäure mit durchschnittlich 2,543 mg und 2,529 mg angegeben. Dieser Wert ist demjenigen bei Stauungsikterus ganz ähnlich, aber verglichen mit dem der Kontrolle (Versuch 3 der Tabelle I) sehr niedrig. Der Adrenalingehalt in 1 g Nebenniere der Kontrolltiere zeigt durchschnittlich 3,09 mg. Dieser Wert ist dem Durchschnittswert 3,18 – 3,25 mg von Folin ganz ähnlich.

Aus diesen Daten geht hervor, dass die Verminderung des Adrenalingehaltes der Nebenniere bei Stauungsikterus durch die überschüssige Zufuhr von Gallensäure bedingt ist.

2. *Einfluss der Ableitung der Galle nach aussen
durch die Gallenblasenfistel auf den
Adrenalingehalt der Nebenniere.*

Die Gallenblasenfistel wurde den Kaninchen, die unter möglichst gleichen Bedingungen gezüchtet worden sind und möglichst gleiches Körpergewicht hatten, genau nach derselben Methode, die in der vorigen Mitteilung angegeben ist, angelegt. Am 3. Tage nach der Operation wurde, indem die Galle aus der Gallenblasenfistel unter Verhinderung jedes Ableckens nach

TABELLE II. A. (Bei peroraler Zufuhr)

Nr.	gegebene Cholsäure (g).	nach Stunden	Körper- gewicht (g).	Gewicht der Ne- ben niere (g).	Totales Adrenalin (mg).	Adrenalin in 1g Ne- benniere (mg).	Durch- schnitts- wert
1	0,1	4 Std.	1760	0,262	0,79	3,04	3,05
2	„		1920	0,312	0,96	3,09	
3	„		1700	0,145	0,43	3,01	
4	„		1910	0,250	0,85	3,43	
5	„		1920	0,280	0,76	2,72	
6	„		1730	0,325	0,98	3,02	
7	0,2	4 Std.	1910	0,270	0,57	2,12	2,51
8	„		1760	0,283	0,78	2,79	
9	„		1700	0,227	0,49	2,16	
10	„		1700	0,235	0,69	2,94	
11	„		1900	0,320	0,58	1,82	
12	„		1880	0,328	0,94	2,88	
13	„		1830	0,147	0,45	3,11	
14	„		1670	0,161	0,37	2,30	
15	0,3	4 Std.	1690	0,158	0,54	3,47	2,92
16	„		1700	0,194	0,55	2,86	
17	„		1740	0,163	0,46	2,84	
18	„		1820	0,248	0,65	2,63	
19	„		1930	0,267	0,75	2,81	
20	„		1720	0,157	0,46	2,94	
21	0,4	4 Std.	1690	0,273	0,73	2,68	2,87
22	„		1650	0,196	0,60	3,09	
23	„		1630	0,161	0,49	3,06	
24	„		1960	0,356	0,89	2,50	
25	„		1800	0,173	0,52	3,05	
26	„		1930	0,208	0,59	2,84	
27	0,5	4 Std.	1950	0,287	0,65	2,27	2,88
28	„		1720	0,201	0,65	3,25	
29	„		1820	0,251	0,76	3,04	
30	„		1740	0,206	0,63	3,07	
31	„		1920	0,251	0,68	2,73	
32	„		1860	0,260	0,75	2,92	

aussen abgeleitet worden war, der Adrenalingehalt der Nebenniere nach der vorigen Methode bestimmt. Aus dem Versuch 2 der Tabelle I sieht man, dass der Adrenalingehalt der Nebenniere bei Ableitung der Galle nach aussen ebenfalls eine individuelle Schwankung zeigt. Aber in den meisten Fällen ist der Adrenalingehalt in 1 g Nebenniere verglichen mit dem der Kontrolle (Versuch 3 der Tabelle I) vermehrt und zwar zeigt der Adrenalingehalt in 1 g Nebenniere bei Ableitung der Galle nach aussen den durchschnittlichen Wert 3,39 mg (Versuch 2 der Tabelle I), während der der Kontrolltiere mit 3,09 mg (Versuch 3 der Tabelle I) angegeben wird.

Aus diesen Daten kann man whol schliessen, dass der Gallensäureverlust, z. B. die Ableitung der Galle nach aussen, einen vermehrten Adrenalingehalt der Nebenniere zeigt.

3. Einfluss der peroralen Zufuhr der Gallensäure auf den Adrenalingehalt der Nebenniere.

Hierbei habe ich ebenfalls Kaninchen zum Versuch verwendet, die vor und während des Versuches unter denselben Bedingungen gezüchtet worden sind und möglichst gleiches Körpergewicht hatten. Während des Versuches habe ich dem Kaninchen 0,1–0,5 g Natriumcholat in einer 1% igen Lösung per os gegeben. Hierauf habe ich den Adrenalingehalt der Nebenniere innerhalb von 2–6 Stunden nach der vorigen Methode bestimmt. Die Resultate sind in Tabelle II A und B zusammengestellt.

Aus der Tabelle II kann man ersehen, dass der Adrenalingehalt hierbei auch eine ziemlich individuelle Schwankung zeigt. In der Mehrzahl der Fälle ist der Adrenalingehalt in 1 g Nebenniere bei peroraler Zufuhr von Gallensäure vermindert, und zwar zeigt der Adrenalingehalt in 1 g Nebenniere bei Zufuhr von 0,2 g Cholat den niedrigsten Durchschnittswert: 2,51 mg, und bei einer Zufuhr 0,1 g Cholat den höchsten Wert: 3,05 mg.

Die Verminderung des Adrenalingehaltes ist am 4. Stunden nach der Zufuhr von Gallensäure am stärksten.

TABELLE II. B. (Bei peroraler Zufuhr)

Nr.	gegebene Cholsäure (g),	nach Stunden	Körper- gewicht (g).	Gewicht der Ne- benniere (g).	Totales Adrenalin (mg).	Adrenalin in 1g Ne- benniere (mg).	Durch- schnitts- wert
1	0,2	2 Std.	1730	0,124	0,40	3,30	3,03
2	„		1900	0,224	0,66	2,95	
3	„		1720	0,178	0,48	2,73	
4	„		1650	0,143	0,48	3,37	
5	„		1830	0,267	0,75	2,82	
6	„		1790	0,240	0,71	2,98	
7	„	3 Std.	1650	0,170	0,58	3,42	2,92
8	„		1920	0,306	0,86	2,84	
9	„		1680	0,113	0,27	2,43	
10	„		1740	0,175	0,54	3,13	
11	„		1950	0,294	0,82	2,81	
12	„		1860	0,259	0,75	2,91	
13	„	5 Std.	1660	0,132	0,39	2,98	2,76
14	„		1720	0,155	0,42	2,76	
15	„		1620	0,123	0,36	2,93	
16	„		2200	0,244	0,65	2,63	
17	„		1820	0,270	0,68	2,52	
18	„		1740	0,142	0,33	2,34	
19	„		2040	0,289	0,89	3,08	
20	„		1960	0,247	0,68	2,79	
21	„	6 Std.	1690	0,138	0,50	3,68	3,05
22	„		2010	0,333	1,05	3,17	
23	„		1820	0,264	0,74	2,84	
24	„		1740	0,143	0,38	2,70	
25	„		1650	0,126	0,36	2,91	
26	„		1900	0,241	0,72	3,02	

Aus den Daten ist ersichtlich, dass der Adrenalingehalt der Nebenniere bei Zufuhr von Gallensäure herabgesetzt wird. Das bedeutet, dass die per os gegebene Gallensäure in den allgemeinen Kreislauf gelangt und entweder die Nebenniere erreichen kann oder unter der Einwirkung der Gallensäure auf die Nervenbahnen die Adrenalinsekretion der Nebenniere hemmt.

ZUSAMMENFASSUNG.

1. Die experimentelle Ableitung der Galle nach aussen durch die Gallenblasenfistel führt bei Kaninchen eine Vermehrung des Adrenalingehaltes der Nebenniere herbei.

2. Der Adrenalingehalt der Nebenniere zeigt bei Stauungsikterus im allgemeinen einen verminderten Wert.

3. Bei peroraler Zufuhr von Gallensäure wird der Adrenalin-gehalt der Nebenniere wie bei Stauungsikterus im allgemeinen herabgesetzt.

Aus diesem Ergebnis geht hervor, dass der Gallensäure-verlust aus dem Organismus den vermehrten Adrenalingehalt der Nebenniere hervorbringt, dagegen die überschüssige Zufuhr von Gallensäure in den Organismus den verminderten Adrenalin-gehalt herbeiführt.

Aus der vorigen Mitteilung und den oben erwähnten Daten kann man wohl schliessen, dass die Hyperglykämie bei Gallen-säureverlust durch die vermehrte Sekretion des antagonistisch wirkenden Adrenalins der Nebenniere, und die Hypoglykämie bei überschüssiger Zufuhr der Gallensäure durch die verminderte Adrenalinsekretion der Nebenniere bedingt ist.

Zum Schluss ist es mir eine angenehme Pflicht, Herrn Prof. Dr. T. Shimizu für seine freundliche Leitung und Anregung bei diesen Versuchen meinen herzlichsten Dank auszusprechen; ferner danke ich dem Unterrichtsministerium ergebenst für das gewährte Stipendium.

LITERATUR.

- Folin-Cannon-Denis. (1912) Journ. of Biol. Chem. **13**, 477.
Kodama S. (1922) Journ. of Biochem. 281.
Misaki K. (1927) Journ. of Biochem. **8**, 249, 238.
Misaki K. (1927) 1. c.
Murakami K. (1928) Journ. of Biochem. **9**, 261.
Murakami K. (1928) Okayama-Igakkaï-Zasshi **40**, 459, 771.
Okamura T. (1928) Journ. of Biochem. **9**, 271.

ÜBER DIE WIRKUNG DER PROTEOLYTISCHEN FERMENTE AUF DIE BENZOYL- UND PHTALYL- DERIVATE DER POLYPEPTIDE.

1. Mitteilung.

Über die Wirkung des Darmerepsins und der Hefeprotease auf Phtalylglycylglycin und Phtalylidiglycylglycin.

VON

SENJI UTZINO.

*(Aus dem medizinisch-chemischen Institut der Kaiserlichen Universität zu
Kyoto, Japan. Direktor: Prof. Dr. K. Mayeda.)*

(Eingegangen am 18. Juni 1928.)

Im Jahre 1924 hat T. Imai (1924) im hiesigen Institut über die Wirkung von Darmerepsin auf die aus Glycin aufgebauten Polypeptide berichtet, deren endständige freie Aminogruppe durch Methylierung oder Benzoylierung gedeckt worden war. Aus seinen Resultaten schloss er, dass sowohl unter den benzoylierten sowie auch den methylierten Polypeptiden die, welche bei totaler Hydrolyse 2 Moleküle Glykokoll liefern, durch Erepsin nicht gespalten werden, sondern erst bei den Peptiden, welche bei der Hydrolyse 3 oder mehr Moleküle Glykokoll erzeugen, eine Spaltung zustande kommt.

Diese Tatsache wurde weiter von R. Murachi (1927) durch Versuche mit den desaminierten Polypeptiden und von A. Matsumoto (1928) durch Versuche mit den β -Naphtalinsulfo-derivaten bestätigt. Nach R. Murachi ergab sich ausserdem, dass Glykolylglycin und Glykolylglycylglycin, die bei den Versuchen mit dem Darmerepsin keine bemerkbare Spaltung zeigten, durch den Hefemazerationssaft angegriffen wurden.

Der Befund von T. Imai, dass das Benzoylglycylglycin durch die Protease aus Schweinedarm nicht gespalten wird, ist bereits von H. v. Euler und K. Josephson (1926) bestätigt worden. Aber nach den Untersuchungen von E. Waldschmidt-

Leitz, W. Grassmann und A. Schöffner (1927) wurde das Acetyl-d, l-Phenylalanyl-d, l-Alanin sowohl durch Darm- als auch durch Heferepsin gespalten. Nach dieser Mitteilung wurde das Verhalten der Hefe-Peptidase zu dem Benzoylglycylglycin von H. v. Euler und K. Josephson (1927) geprüft, wobei sich ergab, dass die Hefe-Peptidase das Benzoylglycylglycin ebenso wenig wie Darmerepsin zu spalten vermag.

Um die fermentative Einstellung dieser beiden Enzyme festzustellen, hielt ich es für wünschenswert, die Versuche auch auf verschiedene Polypeptidderivate auszudehnen, und so studierte ich unter Veranlassung und Leitung von Prof. Dr. K. Mayeda in der vorliegenden Arbeit das Verhalten von Phtalylglycylglycin und Phtalyl diglycylglycin gegen Darm- und Hefepeptidase.

Aus den Resultaten hat sich ergeben, dass Darmerepsin nicht imstande ist, das Phtalylglycylglycin zu spalten, wohl aber das Phtalyl diglycylglycin, während Hefepeptidase die beiden Phtalyl derivate mehr oder weniger zu hydrolysieren vermag. Die Tatsache, dass die Spaltbarkeit des Glycylglycins durch Darmerepsin durch Deckung seiner freien Aminogruppe mit der Phtalylgruppe aufgehoben, aber das Phtalyl derivate des Tripeptids dadurch gespalten wird, spricht für die Richtigkeit von T. Ima's Schlussfolgerung bezüglich des Einflusses der Länge der Peptidkette auf die Darmerepsinwirkung.

Experimenteller Teil.

VERSUCH MIT PHTALYLGlyCYLGLYCIN.

Phtalylglycylglycin wurde nach Percy Brigl und Ernst Klenk (1923) durch Zusammenschmelzen von Phtalsäureanhydrid und Glycylglycin dargestellt.

2,7 g Phtalsäureanhydrid wurden zuerst im Kolben über einer kleinen freien Flamme geschmolzen und dann die halbe Menge von pulverisiertem Glycylglycin dazu getan. Das Gemisch schmolz unter gelinder Gasentwicklung zusammen, und es bildete

sich eine klare, etwas gefärbte Lösung. Nach 5 Minuten wurde mit dem Erhitzen aufgehört. Das Produkt wurde mit Essigäther von überschüssigem Phtalsäureanhydrid entfernt und aus heissem Wasser umkrystallisiert.

Die Substanz bestand aus dünnen Nadeln und schmolz bei 232°C. (unkorr.). Analyse: 0,1845 g Substanz verbrauchten zur Neutralisation des Ammoniaks

$$14,3 \text{ ccm } \frac{n}{10} \text{ Schwefelsäure} \dots \dots \dots N=10,86\%$$

$$\text{Berechnet für } C_{12}H_{10}N_2O_5 \text{ (Mol. -Gew. 262, 096)} \dots N=10,69\%$$

WIRKUNG DES DARMEREPSINS AUF PHTALYLGLYCYLGLYCIN.

Versuch 1.

0,262 g Phtalylglycylglycin wurden in 45 ccm 0,5% iger Sodalösung gelöst und unter Zusatz von 5 ccm Darmerepsinlösung und etwas Toluol bei 37°C. digeriert. Zur Kontrolle wurden 5 ccm Darmerepsinlösung mit 45 ccm 0,5% iger Sodalösung verdünnt und mit etwas Toluol bei 37°C. digeriert.

Von Zeit zu Zeit wurde der Aminostickstoff in 2 ccm Verdauungsflüssigkeit nach Van Slyke bestimmt.

Die in den Versuchen gebrauchte Darmerepsinlösung wurde in folgender Weise hergestellt. Die ausgekratzte Schweinsdarmschleimhaut wurde mit der 3 fachen Menge Glycerin gut verrieben und im Eisschrank aufbewahrt.

Für den Gebrauch wurde die obere Flüssigkeitschicht abpipettiert und mit dem 4 fachen Volumen Wasser verdünnt.

TABELLE I.

Stunden	Amino-N in 2 ccm Verdauungsflüssigkt. (in mg) a	Amino-N in 2 ccm Fermentlösung (Kontrollversuch) (in mg) b	a - b
0	0,126	0,126	0
5	0,125	0,125	0
20	0,136	0,131	+0,005
67	0,159	0,159	0
142	0,163	0,157	+0,006
190	0,163	0,157	+0,006

Versuch 2.

Der Versuch wurde in ganz gleicher Weise wie Versuch 1 ausgeführt.

TABELLE II.

Stunden	Amino-N in 2 ccm Verdaunungsflüssigkt. (in mg) a	Amino-N in 2 ccm Fermentlösung (Kontrollversuch) (in mg) b	a - b
0	0,152	0,152	0
6	0,175	0,181	-0,006
24	0,195	0,195	0
74	0,207	0,207	0
142	0,216	0,211	+0,005
190	0,211	0,211	0

Versuch 3.

Um die Wirksamkeit der in den Versuchen gebrauchten Darmerepsinlösung festzustellen, wurde ihre Wirkung auf Glycylglycin untersucht.

0,132 g Glycylglycin wurden in 36 ccm 0,5% iger Sodalösung gelöst und unter Zusatz von 4 ccm Darmerepsinlösung und 5 ccm Toluol bei 37°C. digeriert. Der Aminostickstoff in 2 ccm wurde nach Van Slyke bestimmt.

TABELLE III.

Stunden	Amino-N in 2 ccm Verdaunungsflüssigkt. (in mg) a	Amino-N in 2 ccm Fermentlösung (Kontrollversuch) (in mg) b	a - b	Zunahme
0	1,047	0,138	0,909	—
5	1,288	0,138	1,150	0,241
20	1,375	0,143	1,232	0,323
50	1,485	0,159	1,326	0,417
122	1,704	0,159	1,545	0,636
194	1,765	0,160	1,605	0,696

Aus Tabelle I, II und III geht hervor, dass Phtalylglycylglycin durch Darmerepsin, welches auf Glycylglycin eine stark hydrolysierende Wirkung aufweist, gar nicht gespalten wird.

WIRKUNG VON HEFEPRESSAFT AUF PHTALYLGLYCYLGLYCIN.

Der Hefepressaft wurde in der unten beschriebenen Weise erhalten.

200 g Presshefe wurden mit 100 g gereinigtem Seesand im Porzellanmörser eine Stunde lang gut zerrieben, dann mit Kieselgur geknetet und durch die Buchnersche Presse (200 kg pro qcm) ausgepresst. Es wurde ein leicht getrübler Pressaft erhalten, welcher beim Gebrauch mit dem 4 fachen Volumen Wasser verdünnt wurde.

Versuch 1.

0,262 g Phtalylglycylglycin wurden in 45 ccm 0,5 % iger Sodalösung gelöst und unter Zusatz von 5 ccm Hefepressaft und 5 ccm Toluol bei 37°C. digeriert. Der Aminostickstoff in 2 ccm wurde nach Van Slyke bestimmt.

TABELLE IV.

Stunden	Amino-N in 2 ccm Verdauungsflüssigkt. (in mg) a	Amino-N in 2 ccm Fermentlösung (Kontrollversuch) (in mg) b	a - b
0	0,375	0,375	0
6	0,383	0,377	0,006
24	0,400	0,379	0,021
70	0,426	0,388	0,038
142	0,443	0,388	0,055
190	0,454	0,388	0,066

WIRKUNG VON HEFEMAZERATIONSSAFT AUF PHTALYLGLYCYLGLYCIN.

Der Hefemazerationssaft wurde in folgender Weise dargestellt:

200 g Presshefe wurden mit 100 g gereinigtem Seesands und 20 ccm Glycerin im Mörser 30 Minuten lang gut zerrieben und dann noch 20 Minuten lang unter Zusatz von 230 ccm Glycerin gut zerrieben und im Eisschrank aufbewahrt.

Beim Gebrauch wurde die obere, schwach getrübbte Flüssigkeit abpipettiert und mit dem halben Volumen Wasser verdünnt.

Versuch 1.

0,131 g Phtalylglycylglycin wurden in 20 ccm 1% iger Soda-lösung gelöst und unter Zusatz von 2 ccm Hefemazerationssaft und 5 ccm Toluol bei 37°C. digeriert. Der Aminostickstoff in 2 ccm wurde nach Van Slyke bestimmt.

TABELLE V.

Stunden	Amino-N in 2 ccm Verdaunungsflüssigkt. (in mg) a	Amino-N in 2 ccm Fermentlösung (Kontrollversuch) (in mg) b	a—b
0	0,186	0,186	0
5	0,219	0,196	0,023
24	0,277	0,219	0,058
45	0,314	0,221	0,093
96	0,328	0,224	0,104
144	0,329	0,223	0,106

Wie aus Tabelle IV und V ersichtlich, wird Phtalylglycylglycin durch Hefe-Presssaft und -Mazerationssaft mehr oder weniger gespaltet. Diese Tatsache stimmt mit den Resultaten gut überein, die R. Murachi bei der Untersuchung der Wirkung der Hefeproteasen auf Glykolyglycylglycin erhielt.

VERSUCH MIT PHTALYLDIGLYCYLGLYCIN.

Phtalylglycylglycin wurde wie bei der Darstellung von Phtalylglycylglycin durch Zusammenschmelzen von Diglycylglycin mit Phtalsäureanhydrid hergestellt.

10 g Phtalsäureanhydrid wurden im Kölbchen im Ölbad

von 200–210°C. geschmolzen und 4 g Diglycylglycin zugesetzt, welches vorher mit der gleichen Menge Phtalsäureanhydrid gut vermischt worden war.

Das Gemisch ging unter gelinder Gasentwicklung allmählich in eine etwas bräunlich gefärbte Schmelze über, wobei die innere Temperatur der Schmelze nicht über 190°C. stieg.

Das Produkt wurde nach 7–8 Minuten in eine Porzellschale gegossen, fein gepulvert, zuerst dreimal mit Essigäther und dann noch dreimal mit Äther digeriert, um das überschüssige Phtalsäureanhydrid zu entfernen, und zuletzt aus 95% igem Alkohol umkrystallisiert. Die Ausbeute betrug 6, 5 g.

Die Substanz bestand aus sehr dünnen, feinen Nadelchen, die sich bei 234–235°C. (unkorr.) in ein stark gefärbtes Öl zersetzten. Sie löste sich in heissem Alkohol und in heissem Wasser, sehr schwer aber in kaltem Wasser, Äther und Essigäther und überhaupt nicht in Petroleumäther, Chloroform und Benzol.

Analyse: 0,1050 g Substanz verbrauchten zur Neutralisation des Ammoniaks

$$9,90 \text{ ccm } \frac{n}{10} - \text{Schwefelsäure} \dots\dots\dots N = 13,21\%$$

Berechnet für $C_{14}H_{13}N_3O_6$ (Mol.-Gew. 319, 128). $N = 13,17\%$

0,1080 g Substanz in heissem Wasser verbrauchten zur

$$\text{Neutralisation in der Hitze} \dots\dots\dots 6,85 \text{ ccm } \frac{n}{10} \text{ NaOH}$$

Berechnet für $HOOC_6H_4CO. NHCH_2CO. NHCH_2CO. NHCH_2COOH$

$$\dots\dots\dots 6,80 \text{ ccm } \frac{n}{10} \text{ NaOH}$$

WIRKUNG VON DARMEREPSIN AUF PHTALYDIGLYCYLGLYCIN.

Versuch 1.

0,3192 g Phtalyldiglycylglycin wurden in 45 ccm 0,5%iger Sodalösung gelöst und mit 5 ccm Erepsinlösung und 5 ccm Toluol bei 37°C. digeriert.

Der Aminostickstoff in 2 ccm wurde nach Van Slyke bestimmt.

TABELLE VI.

Stunden	Amino-N in 2 ccm Verdauungsflüssigkt. (in mg) a	Amino-N in 2 ccm Fermentlösung (Kontrollversuch) (in mg) b	a - b
0	0,126	0,126	0
5	0,142	0,125	0,017
20	0,170	0,131	0,039
67	0,239	0,159	0,080
142	0,320	0,157	0,163
190	0,326	0,157	0,169

Versuch 2.

Der Versuch wurde unter ganz gleichen Bedingungen wie Versuch 1 wiederholt.

TABELLE VII.

Stunden	Amino-N in 2 ccm Verdauungsflüssigkt. (in mg) a	Amino-N in 2 ccm Fermentlösung (Kontrollversuch) (in mg) b	a - b
0	0,152	0,152	0
6	0,197	0,181	0,016
24	0,232	0,195	0,037
74	0,295	0,207	0,088
142	0,349	0,211	0,138
190	0,355	0,211	0,144

*Versuch 3.**(Kontrollversuch)*

Um festzustellen, ob die beobachtete Spaltung nicht etwa auf die Wirkung des Alkalis zurückzuführen ist, wurde folgender Versuch angestellt:

0,3192 g Phtalyldiglycylglycin wurden in 45 ccm 0,5% iger

Sodalösung gelöst und unter Zusatz von 5 ccm Darmerepsinlösung, welche vorher 30 Minuten lang in siedendem Wasserbad erhitzt warm, und 5 ccm Toluol bei 37°C. digeriert.

TABELLE VIII.

Stunden	Amino-N in 2 ccm Verdaunungsflüssigkt. (in mg)	Zunahme
0	0,152	—
6	0,153	+0,001
24	0,151	—0,001
74	0,153	+0,001
142	0,150	—0,002

WIRKUNG VON HEFEPRESSAFT AUF PHTALYLDIGLYCYLGLYCIN.

Versuch 1.

0,3192 g Phtalyldiglycylglycin wurden in 45 ccm 0,5% iger Sodalösung gelöst und unter Zusatz von 5 ccm Hefepressaft und 5 ccm Toluol bei 37°C. digeriert.

Der Aminostickstoff in 2 ccm wurde nach Van Slyke bestimmt.

TABELLE IX.

Stunden	Amino-N in 2 ccm Verdaunungsflüssigkt. (in mg) a	Amino-N in 2 ccm Fermentlösung (Kontrollversuch) (in mg) b	a—b
0	0,375	0,375	0
6	0,388	0,377	0,011
24	0,422	0,379	0,043
70	0,452	0,388	0,064
142	0,499	0,388	0,111
190	0,510	0,388	0,122

WIRKUNG VON HEFEMAZERATIONSSAFT AUF
PHTALYLDIGLYCYLGLYCIN.

Versuch 1.

0,1596 g Phtalyldiglycylglycin wurden in 20 ccm 1% iger Sodalösung gelöst und unter Zusatz von 2 ccm Hefemazerationssaft und 5 ccm Toluol bei 37°C. digeriert. Der Aminostickstoff in 2 ccm wurde nach Van Slyke bestimmt.

TABELLE X.

Stunden	Amino-N in 2 ccm Verdauungsflüssigkt. (in mg) a	Amino-N in 2 ccm Fermentlösung (Kontrollversuch) (in mg) b	a - b
0	0,186	0,186	0
5	0,219	0,196	0,023
24	0,277	0,219	0,058
45	0,314	0,221	0,093
96	0,328	0,224	0,104
144	0,380	0,223	0,107

Wie aus Tabelle VI, VII, VIII, IX und X ersichtlich, wird Phtalyldiglycylglycin sowohl durch Darmerepsin als auch durch Hefeprotease gespalten.

ZUSAMMENFASSUNG.

1. Nicht Phtalylglycylglycin, wohl aber Phtalyldiglycylglycin wird durch Darmerepsin gespalten.

2. Phtalylglycylglycin und Phtalyldiglycylglycin werden durch Hefeprotease mehr oder weniger hydrolysiert.

Es ist mir eine sehr angenehme Pflicht, an dieser Stelle Herrn Prof. Dr. K. Mayeda für seine freundliche Anleitung bei der Ausführung dieser Arbeit meinen herzlichen Dank auszusprechen.

LITERATUR.

- Brigl, P. u. Klenk, E. (1923): Zeitschr. f. physiol. Chem., **131**, 66.
Euler, H. v. u. Josephson, K. (1926): Zeitschr. f. physiol. Chem., **157**, 122.
Euler, H. v. u. Josephson, K. (1927): Berichte d. deutsch. chem. Ges., **60**, 1341.
Imai, T. (1924): Zeitschr. f. physiol. Chem., **136**, 192 und 205.
Murachi, R. (1927): Acta scholae med. univer. imp. in Kioto, **9**, 269 und 279.
Matsumoto, A. (1928): Acta scholae med. univer. imp. in Kioto, **10**, 229.
Waldschmidt-Leitz, E., Grassmann, W. u. Schäffner, A. (1927): Berichte d. deutsch. chem. Ges., **60**, 359.

ÜBER DIE WIRKUNG DER PROTEOLYTISCHEN FERMENTE AUF DIE BENZOYL- UND PHTALYL- DERIVATE DER POLYPEPTIDE.

2. Mitteilung.

Über die Wirkung der Gewebsproteasen auf Benzoyl- und Phtalylglycylglycin.

VON

SENJI UTZINO.

(Aus dem medizinisch-chemischen Institut der Kaiserlichen Universität
zu Kyoto, Japan. Direktor: Prof. Dr. K. Mayeda.)

(Eingegangen am 18. Juni 1928.)

In vielen Versuchen mit verschiedenen Polypeptidderivaten wurde im hiesigen Institut bestätigt, dass, wenn die freie Aminogruppe der Polypeptide angegriffen wird, damit ein gewisser Einfluss auf die Wirkung des Darmerepsins verbunden ist. Es spaltet das Darmerepsin nämlich nur solche Polypeptidderivate, welche ausschliesslich aus Glykokoll aufgebaut und deren freie Aminogruppen durch Methylierung (Imai, 1924), Benzoylierung (1924), Desaminierung (Murachi, 1927) und β -Naphthalinsulfonierung (Matsumoto 1928) angegriffen sind und die bei der Hydrolyse eine gewisse Anzahl von Glykokollmolekülen abgeben.

Diese Tatsache wurde auch vom Verfasser bei der Untersuchung mit Phtalylglycylglycin und Phtalylidiglycylglycin bestätigt.

Da Benzoylglycylglycin und Phtalylglycylglycin nicht durch Darmerepsin, sondern durch Hefeprotease hydrolysiert werden, so dürfte es sehr interessant sein zu untersuchen, wie sie sich gegen die Wirkung der proteolytischen Fermente verschiedener Herkunft verhalten.

Über die Gewebsprotease wurde von E. Abderhalden und seinen Mitarbeitern auf Grund ihrer ausgedehnten erfolgreichen Untersuchungen über die Wirkung der proteolytischen Fermente verschiedener Organe, des Blutes und von Geschwülsten berichtet.

Vor allem wurde Glycylglycin durch Muskel-, Leber- und Nierenpresssaft (Abderhalden *et al.*, 1906), Blutserum und Blutplasma (Abderhalden u. Oppler, 1907) gespalten. In den vorliegenden Versuchen verwendete ich Muskel, Leber und Niere als Fermentquellen.

A) In den Versuchen mit proteolytischen Fermenten aus Muskeln fanden sowohl Rindermuskelpresssaft, als auch Kaninchenmuskelmazerationssaft Verwendung.

Bei beiden Versuchen wurde weder Benzoylglycylglycin noch Phtalylglycylglycin gespalten, trotzdem Glycylglycin, wenn auch in nur geringem Grad, hydrolysiert wurde.

B) In den Experimenten mit Kaninchenleberbrei, sowie Kaninchenleber- und Schweinelebermazerationssaft wurde konstatiert, dass beide Dipeptidderivate in keinem Falle dadurch gespalten wurden, während Glycylglycin und Leucylglycin deutlich durch Lebermazerationssaft angegriffen waren.

Benzoyldiglycylglycin und Phtaloyldiglycylglycin, welche Darmerepsin mehr oder weniger hydrolysierte, wurden durch Lebermazerationssaft nicht gespalten. Ob diese Unspaltbarkeit durch den quantitativen oder qualitativen Unterschied der Fermentwirkung bedingt ist, ist noch eine offene Frage, da die Dipeptid spaltende Kraft des Lebermazerationssafts an sich schon niedriger als die des Darmerepsins ist.

C) Schweinenierenmazerationssaft greift deutlich Benzoylglycylglycin, nicht aber Phtalylglycylglycin an. Diese Fermentlösung hydrolysiert einerseits auch Glycylglycin und andererseits Benzoylglycin. Weiter hat man bei den Versuchen mit Benzoylglycylglycin ebenso wie beim Benzoylglycin die Benzoesäure isoliert. Aber man darf daraus vielleicht nicht ohne weiteres auf die primäre Spaltung der Benzoesäure schliessen.

In solchen Fällen sind nämlich zwei verschiedene Spaltungsweisen denkbar: Erstens wäre es möglich, dass die Hydrolyse bei der Dipeptidbindung des Benzoylglycylglycins durch irgend eine Protease in der Niere stattfindet, die ganz verschieden von Trypsin und Erepsin ist und die Peptidbindung

in sulfonierten Dipeptiden zu spalten imstande ist (noch nicht veröffentlicht), dem dann eine sekundäre Spaltung des Benzoylglycins durch Histozym folgt; zweitens kann die primäre Spaltung der Benzoesäure und die darauf folgende Hydrolyse des Glycylglycins durch Erepsin auftreten, welches Glycylglycin stark anzugreifen vermag.

Der Mechanismus der Spaltungsweise von Benzoylglycylglycin ist so nur dadurch aufzuklären, dass man die einzelnen Fermente in der Niere durch irgend eine Methode, und zwar durch das Adsorptionsverfahren, trennt und ihre Wirkung auf verschiedene Substrate untersucht. Diese Untersuchung ist im hiesigen Institut bereits im Gang.

Experimenteller Teil.

A. MUSKELPROTEASE.

I. Wirkung von Rindermuskelpressaft auf Benzoyl-, Phthalylglycylglycin und Glycylglycin.

Die Fermentlösung wurde in der unten beschriebenen Weise erhalten. 30 g Rindermuskel wurden in der Hackmaschine zerhackt, mit 30 ccm Glycerin gut zerrieben, mit Kieselgur geknetet und in der Buchnerschen Presse (250–300 kg pro qcm) gepresst. Es wurde eine schwach getrübbte, rötlich gefärbte Flüssigkeit erhalten. Sie wurde ohne Verdünnung gebraucht.

Versuch 1.

0,118 g Benzoylglycylglycin wurden in 22,5 ccm 0,5 % iger Sodalösung gelöst und unter Zusatz von 2,5 ccm Muskelpressaft und 5 ccm Toluol bei 37°C. digeriert.

Zur Kontrolle wurden 2,5 ccm Muskelpressaft mit 22,5 ccm 0,5 % iger Sodalösung verdünnt und mit 5 ccm Toluol bei 37°C. digeriert. In beiden Fällen wurde der abgespaltete Aminostickstoff in 2 ccm Verdauungsflüssigkeit nach Van Slyke bestimmt.

TABELLE I.

Stunden	Amino-N in 2 ccm Verdauungsflüssigkeit. (in mg) <i>a</i>	Amino-N in 2 ccm Fermentlösung. (Kontrollversuch)(in mg) <i>b</i>	<i>a - b</i>
0	0,130	0,130	0
24	0,138	0,138	0
48	0,138	0,133	0
168	0,138	0,138	0

Versuch 2.

0,131 g Phtalylglycylglycin wurden in 22,5 ccm 1 % iger Sodalösung gelöst und unter Zusatz von 2,5 ccm Muskelpresssaft und 5 ccm Toluol bei 37°C. digeriert.

TABELLE II.

Stunden	Amino-N in 2 ccm Verdauungsflüssigkeit. (in mg) <i>a</i>	Amino-N in 2 ccm Fermentlösung. (Kontrollversuch)(in mg) <i>b</i>	<i>a - b</i>
0	0,130	0,130	0
24	0,138	0,138	0
48	0,138	0,133	0
168	0,138	0,138	0

Versuch 3.

0,066 g Glycylglycin wurden in 22,5 ccm 0,5 % iger Sodalösung gelöst und unter Zusatz von 2,5 ccm Muskelpresssaft und 5 ccm Toluol bei 37°C. digeriert. Der Aminostickstoff in 2 ccm wurde nach Van Slyke bestimmt.

TABELLE III.

Stunden	Amino-N in 2 ccm Verdauungsflüssigkeit. (in mg) <i>a</i>	Amino-N in 2 ccm Fermentlösung. (Kontrollversuch)(in mg) <i>b</i>	<i>a - b</i>	Zunahme
0	0,814	0,130	0,684	—
24	0,837	0,138	0,699	0,015
48	0,877	0,138	0,739	0,055
168	0,907	0,138	0,769	0,085

II. Wirkung von Kaninchenmuskelmazerationssaft auf Benzoylglycylglycin und Phtalylglycylglycin.

Der Muskelmazerationssaft wurde in folgender Weise hergestellt.

95 g zerhackte Kaninchenmuskeln wurden mit 50 g gereinigtem Seesand im Mörser gut zerrieben, dann nochmals unter Zusatz von 300 ccm Glycerin verrieben und im Eisschrank aufbewahrt. Nach Absetzen der größeren Muskelstückchen wurde die obere Flüssigkeit für den Gebrauch abpipettiert.

Versuch 1.

0,1181 g Benzoylglycylglycin wurden in 22,5 ccm 0,5% iger Sodalösung gelöst und unter Zusatz von 2,5 ccm Muskelmazerationssaft und 5 ccm Toluol bei 37°C. digeriert. Der Aminostickstoff in 2 ccm wurde nach Van Slyke bestimmt.

TABELLE IV

Stunden	Amino-N in 2 ccm Verdauungsflüssigkeit. (in mg) <i>a</i>	Amino-N in 2 ccm Fermentlösung. (Kontrollversuch)(in mg) <i>b</i>	<i>a - b</i>
0	0,172	0,172	0
5	0,172	0,172	0
24	0,178	0,173	+0,005
96	0,173	0,173	0

Versuch 2.

0,1311 g Phtalylglycylglycin wurden in 22,5 ccm 1% iger Sodalösung gelöst und unter Zusatz von 2,5 ccm Muskelmazerationssaft und 5 ccm Toluol bei 37°C. digeriert. Der Aminostickstoff in 2 ccm wurde nach Van Slyke bestimmt.

TABELLE V.

Stunden	Amino-N in 2 ccm Verdauungsflüssigkeit. (in mg) <i>a</i>	Amino-N in 2 ccm Fermentlösung. (Kontrollversuch)(in mg) <i>b</i>	<i>a - b</i>
0	0,172	0,172	0
5	0,172	0,172	0
24	0,173	0,173	0
96	0,173	0,173	0

Aus den Tabellen ist ersichtlich, dass Rindermuskelpressaft sowie Kaninchenmuskelmazerationssaft weder Benzoylglycylglycin noch Phtalylglycylglycin angreifen, während der Muskelpressaft Glycylglycin hydrolysiert, wie das schon früher E. A. b. derhalden und seine Mitarbeiter (1906) feststellen konnten.

B. LEBERPROTEASE.

I. Wirkung von Schweineleberpressaft auf Benzoylglycylglycin, Phtalylglycylglycin und Glycylglycin.

Der Leberpressaft wurde nach folgendem Verfahren hergestellt.

100 g Schweineleber wurden mit 50 g gereinigtem Seesand und 50 ccm Glycerin im Mörser gut zerrieben, dann mit Kieselgur geknetet und in der Buchnerschen Presse (250–300 kg pro qcm) ausgepresst. Es wurde so eine schwachtrübe, rötlich gefärbte Flüssigkeit erhalten.

Versuch 1.

0,1181 g Benzoylglycylglycin wurden in 12,5 ccm 1 % iger Sodalösung und 10 ccm Wasser gelöst und unter Zusatz von 2,5 ccm Leberpressaft und 5 ccm Toluol bei 37°C. digeriert. Der Aminostickstoff in 2 ccm wurde nach Van Slyke bestimmt.

TABELLE VI.

Stunden	Amino-N in 2 ccm Verdauungsflüssigkeit. (in mg) <i>a</i>	Amino-N in 2 ccm Fermentlösung. (Kontrollversuch) (in mg) <i>b</i>	<i>a - b</i>
0	0,300	0,300	0
20	0,300	0,306	-0,006
44	0,306	0,306	0
92	0,316	0,311	+0,005

Versuch 2.

0,1311 g Phtalylglycylglycin wurden in 22,5 ccm 1 % iger Sodalösung gelöst und unter Zusatz von 2,5 ccm Leberpressaft und 5 ccm Toluol bei 37°C. digeriert. Der Aminostickstoff in 2 ccm wurde nach Van Slyke bestimmt.

TABELLE VII.

Stunden	Amino-N in 2 ccm Verdauungsflüssigkeit. (in mg) <i>a</i>	Amino-N in 2 ccm Fermentlösung. (Kontrollversuch) (in mg) <i>b</i>	<i>a - b</i>
0	0,300	0,300	0
20	0,306	0,306	0
44	0,306	0,306	0
92	0,316	0,311	+0,005

Versuch 3.

0,066 g Glycylglycin wurden in 10 ccm 1 % iger Sodalösung und 8 ccm Wasser gelöst und unter Zusatz von 2 ccm Leberpresssaft und 5 ccm Toluol bei 37°C. digeriert. Der Aminostickstoff in 2 ccm wurde nach Van Slyke bestimmt.

TABELLE VIII.

Stunden	Amino-N in 2 ccm Verdauungsflüssigkeit. (in mg) <i>a</i>	Amino-N in 2 ccm Fermentlösung. (Kontrollversuch) (in mg) <i>b</i>	<i>a - b</i>	Zunahme
0	1,194	0,300	0,894	—
20	1,705	0,306	1,399	0,505
44	1,741	0,306	1,435	0,541
92	1,746	0,311	1,435	0,541

II. Wirkung von Kaninchenleberbrei auf Benzoylglycylglycin und Phtalylglycylglycin.

12 g Kaninchenleber wurden mit Seesand gut zerrieben und in 40 ccm physiologischer Kochsalzlösung suspendiert.

Versuch 1.

0,1181 g Benzoylglycylglycin wurden in 12,5 ccm 1 % iger Sodalösung und 10 ccm Wasser gelöst und unter Zusatz von 2,5 ccm Leberbreisuspension und 5 ccm Toluol bei 37°C. digeriert.

Der Aminostickstoff in 2 ccm wurde nach Van Slyke bestimmt.

TABELLE IX.

Stunden	Amino-N in 2 cem Verdauungsflüssigkeit. (in mg) <i>a</i>	Amino-N in 2 cem Fermentlösung. (Kontrollversuch) (in mg) <i>b</i>	<i>a - b</i>
0	0,162	0,162	0
24	0,163	0,163	0
72	0,171	0,171	0
110	0,174	0,174	0

Versuch 2.

0,1311 g Phtalylglycylglycin wurden in 22,5 cem 1 % iger Sodalösung gelöst und unter Zusatz von 2,5 cem Leberbreispension und 5 cem Toluol bei 37°C. digeriert. Der Aminostickstoff in 2 cem wurde nach Van Slyke bestimmt.

TABELLE X.

Stunden	Amino-N in 2 cem Verdauungsflüssigkeit. (in mg) <i>a</i>	Amino-N in 2 cem Fermentlösung. (Kontrollversuch) (in mg) <i>b</i>	<i>a - b</i>
0	0,162	0,162	0
24	0,163	0,163	0
72	0,165	0,171	-0,006
110	0,174	0,174	0

III. Wirkung von Kaninchenlebermazerationssaft auf Benzoylglycylglycin, Benzoyldiglycylglycin Phtalylglycylglycin und Phtalyldiglycylglycin.

Der Kaninchenlebermazerationssaft wurde in folgender Weise hergestellt.

45 g Kaninchenleber wurden mit 90 g Seesand gut zerrieben, dann nochmals mit 135 cem Glycerin gut umgerührt und im Eisschrank aufbewahrt. Nach Absetzung wurde die obere Flüssigkeitsschicht gebraucht.

Versuch 1.

0,0944 g Benzoylglycylglycin resp. 0,1173 g Benzoyldiglycylglycin wurden in 10 cem 1 % iger Sodalösung und 8 cem Was-

ser gelöst und unter Zusatz von 2 ccm Kaninchenlebermazerationssaft und 5 ccm Toluol bei 37°C. digeriert.

Der Aminostickstoff in 2 ccm wurde nach Van Slyke bestimmt.

TABELLE XI.

Stunde	Kontrolle Amino-N in 2 ccm (in mg) <i>a</i>	Benzoylglycyl- glycin. Amino-N in 2 ccm (in mg) <i>b</i>	<i>b - a</i>	Benzoyldiglycyl- glycin. Amino-N in 2 ccm (in mg) <i>c</i>	<i>c - a</i>
0	0,223	0,223	0	0,223	0
6	0,227	0,227	0	0,227	0
20	0,227	0,227	0	0,227	0
72	0,230	0,225	-0,005	0,230	0
144	0,227	0,227	0	0,227	0

Versuch 2.

0,1049 g Phtalylglycylglycin resp. 0,1277 g Phtalyldiglycylglycin wurden in 18 ccm 1% iger Sodalösung gelöst und unter Zusatz von 2 ccm Kaninchenlebermazerationssaft und 5 ccm Toluol bei 37°C. digeriert.

TABELLE XII.

Stunden	Kontrolle Amino-N in 2 ccm (in mg) <i>a</i>	Phtalylglycyl- glycin. Amino-N in 2 ccm (in mg) <i>b</i>	<i>b - a</i>	Phtalyldiglycyl- glycin. Amino-N in 2 ccm (in mg) <i>c</i>	<i>c - a</i>
0	0,223	0,223	0	0,223	0
6	0,227	0,227	0	0,227	0
20	0,227	0,227	0	0,227	0
72	0,230	0,225	-0,005	0,230	0
144	0,227	0,227	0	0,227	0

IV. Wirkung von Kaninchenlebermazerationssaft auf Benzoylglycylglycin, Benzoyldiglycylglycin, Phtalylglycylglycin und Phtalyldiglycylglycin.

Der Kaninchenlebermazerationssaft wurde in folgender Weise hergestellt.

50 g Kaninchenleber wurden mit 100 g Seesand im Porzel-

Ianmörser zermahlen, dann nochmals mit 150 ccm Glycerin gut zerrieben und im Eisschrank aufbewahrt.

Für den Gebrauch wurde die obere Flüssigkeit abpipettiert.

Versuch 1.

0,0944 g Benzoylglycylglycin, resp. 0,1173 g Benzoyldiglycylglycin wurden in 10 ccm 1 % iger Sodalösung und 8 ccm Wasser gelöst und unter Zusatz von 2 ccm Kaninchenlebermazerationssaft und 5 ccm Toluol bei 37°C. digeriert.

TABELLE XIII.

Stunden	Kontrolle Amino-N in 2 ccm (in mg) <i>a</i>	Benzoylglycyl- glycin. Amino-N in 2 ccm (in mg) <i>b</i>	<i>b - a</i>	Benzoyldiglycyl- glycin. Amino-N in 2 ccm (in mg) <i>c</i>	<i>c - a</i>
0	0,204	0,204	0	0,204	0
19	0,202	0,202	0	0,207	+0,005
48	0,204	0,204	0	0,204	0
72	0,205	0,205	0	0,205	0
144	0,205	0,205	0	0,205	0

Versuch 2.

0,1049 g Phtalylglycylglycin resp. 0,1277 g Phtalyldiglycylglycin wurden in 18 ccm 1 % iger Sodalösung gelöst und unter Zusatz von 2 ccm Kaninchenlebermazerationssaft und 5 ccm Toluol bei 37°C. digeriert.

TABELLE XIV.

Stunden	Kontrolle Amino-N in 2 ccm (in mg) <i>a</i>	Phtalylglycyl- glycin. Amino-N in 2 ccm (in mg) <i>b</i>	<i>b - a</i>	Phtalyldiglycyl- glycin. Amino-N in 2 ccm (in mg) <i>c</i>	<i>c - a</i>
0	0,204	0,204	0	0,204	0
19	0,202	0,202	0	0,202	0
48	0,204	0,204	0	0,204	0
72	0,205	0,205	0	0,205	0
144	0,205	0,205	0	0,205	0

V. *Wirkung von Kaninchenlebermazerationssaft auf Glycylglycin und d, l-Leucylglycin.*

Versuch 1.

0,0528 n Glycylglycin resp. 0,0753 g d, l-Leucylglycin wurden in 10 ccm 1 % iger Sodalösung und 8 ccm Wasser gelöst und unter Zusatz von 2 ccm Mazerationssaft und 5 ccm Toluol bei 37°C. digeriert.

TABELLE XV.

Stunden	Kontrolle Amino-N in 2 ccm (in mg) <i>a</i>	Glycylglycin Amino-N in 2 ccm (in mg) <i>b</i>	<i>b - a</i>	Zu- nahme	Leucylglycin Amino-N in 2 ccm (in mg) <i>c</i>	<i>c - a</i>	Zu- nahme
0	0,204	0,925	0,721	—	0,915	0,711	—
19	0,202	1,166	0,964	0,243	1,134	0,932	0,221
48	0,204	1,302	1,098	0,377	1,130	0,926	0,215
72	0,205	1,294	1,089	0,368	1,132	0,927	0,216
144	0,205	1,294	1,089	0,368	1,132	0,927	0,216

Die Resultate zeigen, dass Benzoylglycylglycin, Benzoyldiglycylglycin, Phtalylglycylglycin und Phtalyl diglycylglycin vom Kaninchenlebermazerationssaft nicht zerlegt werden, während der Lebermazerationssaft Glycylglycin und Leucylglycin mehr oder weniger angreift, wie das schon von E. Abderhalden und seinen Mitarbeitern (1906) auf Grund ihrer Untersuchungen über die Wirkung von Leberextrakt und Leberpressaft aus verschiedenen Tieren (Rind und Hund) auf Dipeptide berichtet worden ist.

C. NIERENPROTEASE.

I. *Wirkung von Schweinenierenpressaft auf Benzoylglycylglycin und Glycylglycin.*

Der Pressaft der Schweineniere wurde in folgender Weise hergestellt:

120 g Schweineniere wurden mit Seesand und 90 ccm Glycerin im Porzellanmörser gut zerrieben, mit Kieselgur geknetet und

in der Buchnerschen Presse (250 – 300 kg pro qcm) ausgepresst. Dabei wurde eine etwas getrübe Flüssigkeit erhalten und im Eisschrank aufbewahrt.

Versuch 1.

0,118 g Benzoylglycylglycin wurden in 12,5 ccm 1 % iger Sodalösung und 10 ccm Wasser gelöst und unter Zusatz von 2,5 ccm Nierenpresssaft und 5 ccm Toluol bei 37°C. dirigiert.

0,066 g Glycylglycin wurden in 10 ccm 1 % iger Sodalösung und 8 ccm Wasser gelöst und unter Zusatz von 2 ccm Nierenpresssaft und 5 ccm Toluol bei 37°C. digeriert. Der Amino-stickstoff in 2 ccm wurde nach Van Slyke bestimmt.

TABELLE XVI.

Stunden	Kontrolle Amino-N in 2 ccm (in mg) <i>a</i>	Benzoylglycyl- glycin. Amino-N in 2 ccm (in mg) <i>b</i>	<i>b - a</i>	Glycylglycin Amino-N in 2 ccm (in mg) <i>c</i>	<i>c - a</i>	Zu- nahme
0	0,188	0,188	0	1,088	0,900	—
40	0,194	0,365	0,171	1,658	1,464	0,564
92	0,211	0,492	0,281	1,711	1,500	0,600
140	0,211	0,598	0,387	1,729	1,518	0,618

II. Wirkung von Nierenmazerationssaft auf Benzoyl- glycin, Benzoylglycylglycin, Phtalylglycin, Phtalylglycylglycin, Glycylglycin und Edestin.

Der Mazerationssaft der Schweineniere wurde in folgender Weise hergestellt :

150 g Schweinenierenbrei wurden mit 100 g Seesand im Mörser gut zerrieben und nochmals mit 400 ccm Glycerin gut verrührt. Der Mazerationssaft wurde im Eisschrank aufbewahrt.

Versuch 1.

0,0944 g Benzoylglycylglycin wurden in 10 ccm 1 % iger Sodalösung und 8 ccm Wasser gelöst und unter Zusatz von 2 ccm Mazerationssaft und 5 ccm Toluol bei 37°C. digeriert.

0,1048 g Phtalylglycylglycin wurden in 18 ccm 1 % iger

Proteolytische Fermente und Polypeptidderivate. II 477

Sodalösung gelöst und unter Zusatz von 2 ccm Mazerationssaft und 5 ccm Toluol bei 37°C digeriert. Der Aminostickstoff in 2 ccm wurde nach Van Slyke bestimmt.

TABELLE XVII.

Stunden	Kontrolle Amino-N in 2 ccm (in mg) <i>a</i>	Benzoylglycyl- glycin. Amino-N in 2 ccm (in mg) <i>b</i>	<i>b - a</i>	Phtalylglycyl- glycin. Amino-N in 2 ccm (in mg) <i>c</i>	<i>c - a</i>
0	0,198	0,198	0	0,198	0
15	0,209	0,265	0,059	0,204	-0,005
48	0,218	0,327	0,109	0,213	-0,005
72	0,218	0,392	0,174	0,218	0
144	0,218	0,393	0,175	0,218	0

Versuch 2.

0,358 g Benzoylglycin wurden in 50 ccm 1 % iger Sodalösung und 40 ccm Wasser gelöst und unter Zusatz von 10 ccm Mazerationssaft und 10 ccm Toluol bei 37° digeriert.

0,082 g Phtalylglycin wurden in 18 ccm 1 % iger Sodalösung gelöst und unter Zusatz von 2 ccm Mazerationssaft und 5 ccm Toluol bei 37°C. digeriert.

TABELLE XVIII.

Stunden	Kontrolle Amino-N in 2 ccm (in mg) <i>a</i>	Benzoylglycin Amino-N in 2 ccm (in mg) <i>b</i>	<i>b - a</i>	Phtalylglycin Amino-N in 2 ccm (in mg) <i>c</i>	<i>c - a</i>
0	0,258	0,258	0	0,258	0
15	0,269	0,387	0,118	0,269	0
48	0,268	0,568	0,300	0,268	0
72	0,269	0,763	0,494	0,263	-0,006
144	0,269	0,824	0,555	0,269	0

Versuch 3.

0,1048 g Phtalylglycylglycin wurden in 18 ccm 1 % iger Sodalösung gelöst und unter Zusatz von 2 ccm Schweinenierenmazerationssaft und 5 ccm Toluol bei 37°C. digeriert.

TABELLE XIX.

Stunden	Amino-N in 2 ccm Verdauungsflüssigkeit. (in mg) <i>a</i>	Amino-N in 2 ccm Fermentlösung (Kontrollversuch)(in mg) <i>b</i>	<i>a - b</i>
0	0,258	0,258	0
15	0,269	0,269	0
48	0,268	0,268	0
72	0,263	0,269	-0,006
144	0,269	0,269	0

Versuch 4.

0,0528 g Glycylglycin wurden in 10 ccm 1 % iger Sodalösung und 8 ccm Wasser gelöst und unter Zusatz von 2 ccm Mazerationssaft und 5 ccm Toluol bei 37°C. digeriert.

0,2 g Edestin wurden in 10 ccm 1 % iger Sodalösung und 8 ccm Wasser gelöst und mit 2 ccm Mazerationssaft und 5 ccm Toluol bei 37°C. digeriert.

TABELLE XX.

Stunden	Kontrolle Amino-N in 2 ccm (in mg) <i>a</i>	Glycylglycin Amino-N in 2 ccm (in mg) <i>b</i>	<i>b - a</i>	Zu- nahme	Edestin Amino-N in 2 ccm (in mg) <i>c</i>	<i>c - a</i>	Zu- nahme
0	0,198	0,893	0,695	—	0,231	0,033	—
15	0,209	1,212	1,003	0,308	0,242	0,033	0
48	0,218	1,286	1,068	0,373	0,245	0,027	-0,006
72	0,218	1,297	1,079	0,384	0,245	0,027	-0,006
144	0,218	1,310	1,092	0,397	0,246	0,028	-0,005

Versuch 5.

0,1181 g Benzoylglycylglycin resp. 0,0895 g Benzoylglycin wurden in 10 ccm 1 % iger Sodalösung und 8 ccm Wasser gelöst und unter Zusatz von 2 ccm Nierenmazerationssaft und 5 ccm Toluol bei 37°C. digeriert.

TABELLE XXI.

Stunden	Kontrolle Amino-N in 2 cem (in mg) <i>a</i>	Benzoylglycyl- glycin. Amino-N in 2 cem (in mg) <i>b</i>	<i>b - a</i>	Benzoylglycin Amino-N in 2 cem (in mg) <i>c</i>	<i>c - a</i>
0	0,162	0,162	0	0,162	0
5	0,167	0,190	0,023	0,196	0,029
27	0,173	0,289	0,116	0,301	0,128
48	0,173	0,392	0,219	0,415	0,242
120	0,173	0,647	0,474	0,647	0,474
192	0,172	0,686	0,514	0,698	0,526

Versuch 6.

1,18 g Benzoylglycylglycin resp. 0,90 g Benzoylglycin wurden in 100 cem 1 % iger Sodalösung und 70 cem Wasser gelöst und unter Zusatz von 30 cem Schweinenierenmazerationssaft und etwas Toluol bei 37°C. digeriert.

TABELLE XXII.

Stunden	Kontrolle Amino-N in 2 cem (in mg) <i>a</i>	Benzoylglycyl- glycin. Amino-N in 2 cem (in mg) <i>b</i>	<i>b - a</i>	Benzoylglycin Amino-N in 2 cem (in mg) <i>c</i>	<i>c - a</i>
0	0,241	0,241	0	0,241	0
24	0,247	0,427	0,180	0,767	0,520
96	0,276	0,983	0,707	0,983	0,707
144	0,276	0,983	0,712	0,983	0,707

Nach dem Beenden der Spaltung wurde die Verdauungsflüssigkeit mit dem Benzoylglycylglycin nach Ansäuern mit Salzsäure im Sutoschen Extraktionsapparate mit Petroleumäther 4 Tage lang extrahiert. Nach Abdampfen des Petroleumäthers wurde der Rückstand 2 mal aus heissem Wasser umkrystallisiert (0,093 g). Es krystallisierten flache Nadeln aus, die bei 121°C. (unkorr.) schmolzen und sublimierten. Daraus ging klar hervor, dass bei der Wirkung von Nierenmazerationssaft aus dem Benzoylglycylglycin die Benzoesäure isoliert wurde.

Andererseits wurde im parallel ausgeführten Versuche mit Hippursäure nach demselben Verfahren eine Substanz erhalten, welche auch bei 121°C. (unkorr.) schmolz und sublimierte.

Aus den vorliegenden Resultaten ist ersichtlich, dass Schweinenierenprotease nicht Phtalylglycin und Phtalylglycylglycin, wohl aber Benzoylglycin und Benzoylglycylglycin zu spalten vermag. Aus der Verdauungsflüssigkeit mit Benzoylglycylglycin wurde wie mit Hippursäure die Benzoessäure isoliert.

Auch ergab sich, dass der Nierenmazerationssaft in deutlichem Masse Glycylglycin zerlegt, wie das schon beim Versuch mit dem Hundenierenpressaft von E. Abderhalden und Y. Teruuchi (1906) berichtet worden ist.

ZUSAMMENFASSUNG.

1. Weder Rindermuskelpressaft noch Kaninchenmuskelmazerationssaft greifen Benzoylglycylglycin und Phtalylglycylglycin an.

2. Schweineleberpressaft, Kaninchenleberbrei und Kaninchenlebermazerationssaft spalten diese beiden Dipeptidderivate nicht, während der Mazerationssaft Glycylglycin und Leucylglycin deutlich hydrolysiert.

Bei den Versuchen mit Benzoyldiglycylglycin und Phtalydiglycylglycin kommt keine Spaltung zustande.

3. Schweinenierenmazerationssaft kann Benzoylglycin, Benzoylglycylglycin und Glycylglycin spalten. Aus der Verdauungsflüssigkeit mit Benzoylglycylglycin wurde die Benzoessäure isoliert. Aber die Hydrolyse des Phtalylglycylglycins und Phtalylglycins liess sich nicht feststellen.

Zum Schlusse möchte der Verfasser Herrn Prof. Dr. K. Mayeda seinen verbindlichsten Dank aussprechen für seine freundliche Anleitung, die er dem Verfasser bei der Ausführung dieser Arbeit hat zuteil werden lassen.

LITERATUR.

- Abderhalden, E. u. Teruuchi, Y. (1906): Zeitschr. f. physiol. Chem., **47**, 466.
- Abderhalden, E. u. Hunter, A. (1906): Zeitschr. f. physiol. Chem., **48**, 537.
- Abderhalden, E. u. Teruuchi, Y. (1906): Zeitschr. f. physiol. Chem., **49**, 1.
- Abderhalden, E. u. Rona, P. (1906): Zeitschr. f. physiol. Chem., **49**, 31.
- Abderhalden, E. u. Oppler, B. (1907): Zeitschr. f. physiol. Chem., **53**, 294.
- Imai, T. (1924): Zeitschr. f. physiol. Chem., **136**, 192 u. 205.
- Murachi, R. (1927): Acta scholae med. univer. imp. in Kioto, **9**, 269.
- Matsumoto, A. (1928): Acta scholae med. univer. imp. in Kioto, **10**, 229.

ÜBER DIE WIRKUNG DER PROTEOLYTISCHEN FERMENTE AUF DIE BENZOYL- UND PHTALYLDERIVATE DER POLYPEPTIDE.

3. Mitteilung.

Über die Wirkung der Pankreasproteasen auf Benzoyl- und Phtalylglycylglycin.

VON

SENJI UTZINO.

(Aus dem medizinisch-chemischen Institut der Kaiserlichen Universität
zu Kyoto, Japan. Direktor: Prof. Dr. K. Mayeda.)

(Eingegangen am 18. Juni 1928.)

Nach der Feststellung der Unspaltbarkeit des Benzoylglycylglycins durch Darmerepsin von T. Imai (1924) wurde in den vorigen Untersuchungen festgestellt, dass Phtalylglycylglycin durch Darmerepsin, Benzoyl- und Phtalylglycylglycin durch Muskel- und Leberprotease gar nicht gespalten werden, während sich Glycylglycin mehr oder weniger dadurch angegriffen fand.

Nur die Nierenprotease greift deutlich Benzoylglycylglycin an, nicht aber Phtalylglycylglycin. Also ergibt sich aus diesen Resultaten, dass Glycylglycin durch Deckung seiner freien Aminogruppe mit der Benzoyl- oder Phtalylgruppe gegen gewisse proteolytische Fermente widerstandsfähiger wird.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung der proteolytischen Fermente aus der Pankreasdrüse auf diese beiden Dipeptidderivate untersucht.

Pankreatin (E. Merck), Pankreatinextrakt, Schweinepankreasbrei sowie Pankreaspresssaft und der Glycerinextrakt aus Pankreastrockenpräparat griffen deutlich Benzoyl- und Phtalylglycylglycin an. In einem Versuch mit dem aktivierten Pankreassaft, der Glycylglycin gar nicht spaltete, wurde Benzoylglycylglycin dadurch deutlich hydrolysiert.

Aus der Verdauungsrestlösung mit Benzoylglycylglycin durch Pankreaspulverglycerinextrakt wurde Benzoylglycin isoliert, was zeigt, dass Benzoylglycylglycin bei der Dipeptidbindung durch Pankreasprotease gespalten wird.

Um den Einfluss der Aktivierung auf die Spaltbarkeit der beiden Dipeptidderivate zu untersuchen, wurden die Versuche mit dem aktivierten oder mit dem nicht aktivierten Pankreasextrakt ausgeführt. Nach der Aktivierung zeigte der Pankreasextrakt eine verstärkte, hydrolysierende Wirkung auf Benzoyl- und Phtalylglycylglycin wie auf Edestin und Gelatin. Dagegen wurde Glycylglycin unabhängig von der Aktivierung fast gleichmässig dadurch gespalten.

Da Darmerepsin nicht imstande ist, Benzoyl- und Phtalylglycylglycin zu hydrolysieren, ist es eine interessante Aufgabe festzustellen, in welcher Fraktion der Pankreasproteasen sich das Ferment befindet, welches diese beiden Dipeptidderivate angreift. Um das Pankreastrepsin vom Erepsin zu trennen, wurde die Trennung nach der Methode von E. Waldschmidt-Leitz und A. Harteneck (1925) ausgeführt und festgestellt, dass die Trypsinfraktion, welche Edestin deutlich hydrolysierte aber Glycylglycin fast nicht spaltete, deutlich Benzoyl- und Phtalylglycylglycin angriff.

Nach diesen Resultaten ist es sehr wahrscheinlich, dass Benzoyl- und Phtalylglycylglycin durch Pankreastrepsin selbst oder durch ein dem Trypsin sehr nahe verwandtes Ferment in der Pankreasdrüse gespalten werden.

Experimenteller Teil.

I. WIRKUNG VON PANKREATIN (E. MERCK) AUF BENZOYL- UND PHTALYLGLYCYLGLYCIN.

0,2361 g Benzoylglycylglycin resp. 0,2622 g Phtalylglycylglycin wurden in 40 ccm 0,5 % iger Sodalösung resp. 0,7 % iger Sodalösung gelöst und unter Zusatz von 0,4 g Pankreatin und 5 ccm Toluol bei 37°C. digeriert.

Zur Kontrolle wurden 0,4 g Pankreatin in 40 ccm 0,5 % iger Sodalösung gelöst und unter Zusatz von 5 ccm Toluol bei 37° C. digeriert.

In allen Fällen wurde der abgespaltete Aminostickstoff in 2 ccm Verdauungsflüssigkeit nach Van Slyke bestimmt.

TABELLE I.

Stunden	Kontrolle Amino-N in 2 ccm (in mg) <i>a</i>	Benzoylglycyl- glycin. Amino-N in 2 ccm (in mg) <i>b</i>	<i>b</i> - <i>a</i>	Phtalylglycyl- glycin. Amino-N in 2 ccm (in mg) <i>c</i>	<i>c</i> - <i>a</i>
0	0,232	0,232	0	0,232	0
20	0,260	0,306	0,046	0,312	0,052
48	0,279	0,360	0,081	0,349	0,070
114	0,292	0,420	0,128	0,408	0,116
142	0,285	0,407	0,122	0,396	0,111

II. WIRKUNG VON PANKREATINGLYCERINEXTRAKT AUF BENZOYL- UND PHTALYLGLYCYLGLYCIN.

Pankreatinglycerinextrakt wurde in folgender Weise hergestellt.

1 g Pankreatin (E. Merck) wurde mit 5 ccm Glycerin im Brutschrank bei 37°C 24 Stunden lang aufbewahrt und die obere gelbliche Flüssigkeit abpipettiert.

0,2361 g Benzoylglycylglycin resp. 0,2622 g Phtalylglycylglycin wurden in 36 ccm 0,5 % iger resp. 0,7 % iger Sodalösung gelöst und unter Zusatz von 4 ccm Glycerinextrakt und 5 ccm Toluol bei 37°C. digeriert.

Zur Kontrolle wurden 4 ccm Glycerinextrakt mit 36 ccm 0,5 % iger Sodalösung versetzt und unter Zusatz von 5 ccm Toluol bei 37°C. digeriert.

Der Aminostickstoff in 2 ccm wurde nach Van Slyke bestimmt.

TABELLE II.

Stunden	Kontrolle Amino-N in 2 ccm (in mg) <i>a</i>	Benzoylglycyl- glycin. Amino-N in 2 ccm (in mg) <i>b</i>	<i>b - a</i>	Phtalylglycyl- glycin. Amino-N in 2 ccm (in mg) <i>c</i>	<i>c - a</i>
0	0,220	0,220	0	0,220	0
24	0,268	0,338	0,070	0,303	0,035
48	0,294	0,396	0,102	0,341	0,047
120	0,290	0,398	0,108	0,353	0,063

III. WIRKUNG VON PANKREASSUSPENSION AUF BENZOYL- UND PHTALYLGLYCYLGLYCIN.

12 g Schweinepankreasbrei wurden mit 10 g Seesand im Mörser zerrieben und unter Zusatz von 20 ccm physiologischer Kochsalzlösung gut umgerührt.

Die stark getrübbte Suspensionsflüssigkeit wurde abpipettiert.

0,1181 g Benzoylglycylglycin resp. 0,1311 g Phtalylglycylglycin wurden in 12,5 ccm 1% iger Sodalösung und 10 ccm Wasser resp. in 22,5 ccm 1% iger Sodalösung gelöst und unter Zusatz von 2,5 ccm Pankreassuspension und 5 ccm Toluol bei 37°C. digeriert.

Zur Kontrolle wurden 2,5 ccm Pankreassuspension mit 12,5 ccm 1% iger Sodalösung und 10 ccm Wasser versetzt und mit 5 ccm Toluol bei 37°C. digeriert.

Der Aminostickstoff in 2 ccm wurde nach Van Slyke bestimmt.

TABELLE III.

Stunden	Kontrolle Amino-N in 2 ccm (in mg) <i>a</i>	Benzoylglycyl- glycin. Amino-N in 2 ccm (in mg) <i>b</i>	<i>b - a</i>	Phtalylglycyl- glycin. Amino-N in 2 ccm (in mg) <i>c</i>	<i>c - a</i>
0	0,144	0,144	0	0,144	0
24	0,198	0,268	0,070	0,292	0,094
72	0,247	0,353	0,106	0,353	0,106
110	0,250	0,407	0,157	0,407	0,157
200	0,247	0,424	0,177	0,412	0,165

IV. WIRKUNG VON PANKREASPRESSAFT AUF BENZOYL-
GLYCYLGLYCIN, PHTALYLGLYCYLGLYCIN, HIPPURSÄURE
UND GLYCYLGLYCIN.

Der in den Versuchen gebrauchte Pankreaspresssaft wurde in folgender Weise hergestellt: 100 g Schweinepankreas wurden im Porzellanmörser gut zerrieben, dann mit Kieselgur geknetet und in der Buchnerschen Presse (250 – 300 kg pro qcm) gepresst. Der Presssaft war leicht getrübt und wurde im Eisschrank aufbewahrt.

0,1181 g Benzoylglycylglycin resp. 0,1311 g Phtalylglycylglycin wurden in 12,5 ccm 1 % iger Sodalösung und 10 ccm Wasser resp. in 22,5 ccm 1 % iger Sodalösung gelöst und unter Zusatz von 2,5 ccm Presssaft und 5 ccm Toluol bei 37°C. digeriert.

TABELLE IV.

Stunden	Kontrolle Amino-N in 2 ccm (in mg) <i>a</i>	Benzoylglycyl- glycin. Amino-N in 2 ccm (in mg) <i>b</i>	<i>b - a</i>	Phtalylglycyl- glycin. Amino-N in 2 ccm (in mg) <i>c</i>	<i>c - a</i>
0	0,156	0,156	0	0,156	0
24	0,244	0,325	0,081	0,314	0,070
48	0,286	0,385	0,099	0,373	0,087
72	0,301	0,434	0,133	0,393	0,092
168	0,304	0,436	0,132	0,401	0,097

Zur Kontrolle wurde die Wirkung von Pankreaspresssaft auf Hippursäure und Glycylglycin untersucht.

0,0895 g Hippursäure resp. 0,066 g Glycylglycin wurden in 12,5 ccm 1 % iger Sodalösung und 10 ccm Wasser gelöst und unter Zusatz von 2,5 ccm Pankreaspresssaft und 5 ccm Toluol bei 37°C. digeriert.

Der Aminostickstoff in 2 ccm wurde nach Van Slyke bestimmt.

TABELLE V.

Stunden	Kontrolle Amino-N in 2 cem (in mg) <i>a</i>	Benzoylglycin Amino-N in 2 cem (in mg) <i>b</i>	<i>b - a</i>	Glycylglycin Amino-N in 2 cem (in mg) <i>c</i>	<i>c - a</i>	Zu- nahme
0	0,156	0,156	0	0,841	0,685	—
24	0,244	0,250	+0,006	0,999	0,755	0,070
48	0,286	0,292	+0,006	—	—	—
72	0,301	0,301	0	1,249	0,948	0,263
144	0,304	0,304	0	1,249	0,945	0,260

V. WIRKUNG VON HUNDEPANKREASSAFT AUF BENZOYL- GLYCYLGLYCIN UND GLYCYLGLYCIN.

Der hier in den Versuchen gebrauchte Pankreassaft wurden der Pankreasfistel eines operierten Hundes entnommen und beim Gebrauch mit 0,5% iger Calciumchloridlösung aufs 20 fache verdünnt.

0,118 g Benzoylglycylglycin resp. 0,066 g Glycylglycin wurde in 12,5 cem 1% iger Sodalösung und 10 cem Wasser gelöst und unter Zusatz von 2,5 cem verdünnten Pankreassaftes und 5 cem Toluol bei 37°C. digeriert.

Zur Kontrolle wurden 2,5 cem verdünnten Pankreassaftes mit 12,5 cem 1% iger Sodalösung und 10 cem Wasser versetzt und nach Zusatz von 5 cem Toluol bei 37°C. digeriert. Der Aminostickstoff in 2 cem wurde nach Van Slyke bestimmt.

TABELLE VI.

Stunden	Kontrolle Amino-N in 2 cem (in mg) <i>a</i>	Benzoylglycyl- glycin. Amino- N in 2 cem (in mg) <i>b</i>	<i>b - a</i>	Glycylglycin Amino-N in 2 cem (in mg) <i>c</i>	<i>c - a</i>	Zu- nahme
0	0,120	0,120	0	0,831	0,711	—
20	0,132	0,264	0,132	0,838	0,706	-0,005
44	0,132	0,299	0,167	0,844	0,712	+0,001
140	0,132	0,333	0,201	0,844	0,712	+0,001

VI. WIRKUNG VON GLYCERINEXTRAKT AUS GETROCKNETEM
SCHWEINEPANKREAS AUF BENZOYLGLYCYLGLYCIN,
PHTALYLGLYCYLGLYCIN UND GLYCYLGLYCIN.

Der Glycerinextrakt von getrocknetem Pankreas wurde in folgender Weise hergestellt: 200 g zerriebenes Schweinepankreas wurden zuerst 3 mal mit 600 ccm Aceton, dann 400 ccm Aceton-Äther und zuletzt mit Äther entwässert.

Nachdem das Präparat mittels eines elektrischen Fachers und dann im Exsikkator getrocknet worden war, wurde es im Mörtel zerrieben und gesiebt. Das feine Pankreaspulver betrug 38 g. 3 g Pankreaspulver wurden mit 20 ccm Glycerin und 15 ccm Wasser gut umgerührt und unter Zusatz von etwas Chloroform im Brutschrank (37°) 8 Stunden lang aufbewahrt.

Der Glycerinextrakt wurde zentrifugiert und die klare Flüssigkeit dekantiert. Diese Flüssigkeit wurde verwendet.

0,0944 g Benzoylglycylglycin resp. 0,1048 g Phtalylglycylglycin wurden in 10 ccm 1% iger Sodalösung und 8 ccm Wasser resp. in 18 ccm 1% iger Sodalösung gelöst und unter Zusatz von 2 ccm Glycerinextrakt und 5 ccm Toluol bei 37°C. digeriert.

Zur Kontrolle wurden 2 ccm Glycerinextrakt mit 10 ccm 1% iger Sodalösung und 8 ccm Wasser versetzt und mit 5 ccm Toluol bei 37°C. digeriert.

Der Aminostickstoff in 2 ccm Verdauungsflüssigkeit wurde nach Van Slyke bestimmt.

TABELLE VII.

Stunden	Kontrolle Amino-N in 2 ccm (in mg) <i>a</i>	Benzoylglycyl- glycin. Amino-N in 2 ccm (in mg) <i>b</i>	<i>b - a</i>	Phtalylglycyl- glycin. Amino-N in 2 ccm (in mg) <i>c</i>	<i>c - a</i>
0	0,208	0,208	0	0,208	0
14	0,336	0,564	0,228	0,444	0,108
44	0,389	0,832	0,443	0,567	0,178
70	0,442	0,972	0,530	0,625	0,183
144	0,512	1,068	0,556	0,698	0,186

Zur Kontrolle wurden 0,0528 g Glycylglycin in 10 ccm 1 % iger Sodalösung und 8 ccm Wasser gelöst und unter Zusatz von 2 ccm Glycerinextrakt und 5 ccm Toluol bei 37°C. digeriert.

TABELLE VIII.

Stunden	Fermentlösung Amino-N in 2 ccm (in mg) <i>a</i>	Glycylglycin. Amino-N in 2 ccm (in mg) <i>b</i>	<i>b - a</i>	Zunahme
0	0,208	0,921	0,713	—
14	0,336	1,491	1,155	0,442
44	0,389	1,755	1,366	0,653
70	0,442	1,806	1,364	0,651

VII. WIRKUNG VON GLYCERINEXTRAKT AUS GETROCKNETEM
PANKREASPULVER AUF BENZOYLGLYCYLGLYCIN
UND BENZOYLGLYCIN.

5 g getrocknetes Pankreaspulvers wurden mit 30 ccm Glycerin und 20 ccm Wasser gut umgerührt und unter Zusatz von etwas Chloroform bei Bruttemperatur 8 Stunden lang aufbewahrt. Nach dem Zentrifugieren wurde eine gelblich gefärbte und fast klare Flüssigkeit erhalten. Für den Gebrauch wurden 20 ccm dieses Extraktes mit 10 ccm Wasser verdünnt.

0,5901 g Benzoylglycylglycin wurden in 53 ccm 1 % iger Sodalösung und 37 ccm Wasser gelöst und unter Zusatz von 10 ccm Glycerinextrakt und 10 ccm Toluol bei 37°C. digeriert.

0,1790 g Benzoylglycin wurden in 20 ccm 1 % iger Sodalösung und 16 ccm Wasser gelöst und unter Zusatz von 4 ccm Glycerinextrakt und 5 ccm Toluol bei 37°C. digeriert.

TABELLE IX.

Stunden	Kontrolle Amino-N in 2 ccm (in mg) <i>a</i>	Benzoylglycyl- glycin. Amino-N in 2 ccm (in mg) <i>b</i>	<i>b - a</i>	Benzoylglycin. Amino-N in 2 ccm (in mg) <i>c</i>	<i>c - a</i>
0	0,185	0,185	0	0,185	0
20	0,261	0,534	0,273	0,267	+0,006
70	0,455	0,898	0,443	0,450	-0,005
144	0,463	1,054	0,591	0,563	0

Die Restlösung des Versuchs mit Benzoylglycylglycin wurde nach Ansäuern mit Salzsäure im Sutoschen Extraktionsapparat 4 Tage lang mit Aether extrahiert. Die nach Abdampfen des Äthers zurückgebliebene Substanz krystallisierte aus heissem Wasser in derben Nadeln, welche bei 187°C (unkorr.) schmolzen.

Analyse: 0,0178 g Substanz verbrauchten zur Neutralisation des Ammoniaks

4,90 ccm n/50 Schwefelsäure N=7,71 %

Berechnet für $C_6H_5CO \cdot NHCH_2COOH$. . N=7,82 %

VIII. WIRKUNG VON GLYCERINEXTRAKT AUS GETROCKNETEM PANKREASPULVER AUF BENZOYLGLYCYLGLYCIN UND BENZOYLGLYCIN.

10 g Pankreaspulver wurden mit 60 ccm Glycerin und 40 ccm Wasser unter Zusatz von 5 ccm Toluol bei 37°C. 8 Stunden lang aufbewahrt. Das Extrakt wurde zentrifugiert und dekantiert.

0,590 g Benzoylglycylglycin wurden in 90 ccm 0,6 % iger Sodalösung gelöst und unter Zusatz von 10 ccm Glycerinextrakt und 10 ccm Toluol bei 37°C. digeriert.

0,1791 g Benzoylglycin wurden in 36 ccm 0,6 % iger Sodalösung gelöst und unter Zusatz von 4 ccm Glycerinextrakt und 5 ccm Toluol bei 37°C. digeriert.

TABELLE X.

Stunden	Kontrolle Amino-N in 2 ccm (in mg) <i>a</i>	Benzoylglycyl- glycin. Amino-N in 2 ccm (in mg) <i>b</i>	<i>b - a</i>	Benzoylglycin. Amino-N in 2 ccm (in mg) <i>c</i>	<i>c - a</i>
0	0,214	0,214	0	0,214	0
19	0,335	0,703	0,368	0,335	0
48	0,419	0,977	0,558	0,424	+0,005
96	0,485	1,132	0,647	0,490	+0,005
168	0,519	1,190	0,671	0,519	0

Der Rest der Verdauungsflüssigkeit mit Benzoylglycylglycin wurde mit Salzsäure angesäuert und im Sutoschen Extrak-

tionsapparat 4 Tage lang mit Äther extrahiert. Die nach Abdampfen des Äthers erhaltene Substanz krystallisierte aus heissem Wasser in derben Nadeln (0,09 g), welche bei 186–187° (unkorr.) schmolzen.

Analyse: 0,0162 g Substanz verbrauchten zur Neutralisation des Ammoniaks

4,50 ccm $n/50$ Schwefelsäure $N=7,78\%$

Berechnet für $C_6H_5CO.NHCH_2COOH$.. $N=7,82\%$

Aus diesen Resultaten ist ersichtlich, dass die Wirkung von Glycerinextrakt aus getrocknetem Pankreaspulver auf Benzoylglycylglycin das Benzoylglycin befreit wurde, also die Verkettung zwischen Benzoylglycin und Glycin gelöst war. Über die Spaltung des Phtalylglycylglycins ist jetzt die Untersuchung im Gange.

IX. WIRKUNG VON AKTIVIERTEM UND NICHT AKTIVIERTEM
PANKREASEXTRAKT AUF BENZOYLGLYCYLGLYCIN,
PHTALYLGLYCYLGLYCIN, EDESTIN, GELATIN
UND GLYCYLGLYCIN.

150 g Schweinepankreasbrei wurden mit 450 ccm Glycerin mässig umgerührt, 1 Stunde lang bei Zimmertemperatur stehen gelassen und dann zentrifugiert, um die schwach getrübbte obere Flüssigkeit zu erhalten. Als Enterokinaselösung wurde das Glycerinextrakt ans Rinderdarmschleimhaut verwendet.

5 ccm Pankreasglycerinextrakt wurden mit 1 ccm Enterokinaselösung gut vermischt, 30 Minuten lang bei Zimmertemperatur stehen gelassen und dann mit 14 ccm 50 % igen Glycerins vermischt. Bei den Kontrollversuchen mit nichtaktivierter Fermentlösung wurden 5 ccm Pankreasextrakt nur mit 1 ccm Glycerin anstatt Enterokinaselösung vermischt und dann mit 14 ccm 50 % igen Glycerins versetzt.

Versuch 1.

0,1181 g Benzoylglycylglycin wurden in 12,5 ccm 1 % iger Sodalösung und 10 ccm Wasser gelöst und unter Zusatz von 2,5 ccm aktivierten (1) oder 2,5 ccm nichtaktivierten Pankreas-

extraktes (2) und 5 ccm Toluol bei 37°C. digeriert.

Zur Kontrolle wurden 2,5 ccm aktivierten (1) resp. nicht-aktivierten Pankreasextraktes (2) mit 12,5 ccm 1% iger Soda-lösung und 10 ccm Wasser verdünnt und unter Zusatz von 5 ccm Toluol bei 37°C digeriert.

TABELLE XI.

Stunden	(1) Kontrolle Amino-N in 2 ccm (in mg) <i>a</i>	(1) Benzoylglycyl- glycin, Amino-N in 2 ccm (in mg) <i>b</i>	<i>b - a</i>	(2) Kontrolle Amino-N in 2 ccm (in mg) <i>c</i>	(2) Benzoylglycyl- glycin, Amino-N in 2 ccm (in mg) <i>d</i>	<i>d - c</i>
0	0,134	0,134	0	0,134	0,134	0
17	0,146	0,247	0,101	0,134	0,157	0,023
48	0,168	0,280	0,112	0,140	0,168	0,028
120	0,171	0,319	0,148	0,158	0,259	0,101
144	0,169	0,395	0,226	0,158	0,314	0,156

Versuch 2.

0,1311 g Phthalylglycylglycin wurden in 22,5 ccm 1% iger Sodalösung gelöst und unter Zusatz von 2,5 ccm aktivierten (3) oder 2,5 ccm nichtaktivierten Pankreasextraktes (4) und je 5 ccm Toluol bei 37°C. digeriert.

TABELLE XII.

Stunden	(3) Kontrolle Amino-N in 2 ccm (in mg) <i>a</i>	(3) Phthalylglycyl- glycin, Amino-N in 2 ccm (in mg) <i>b</i>	<i>b - a</i>	(4) Kontrolle Amino-N in 2 ccm (in mg) <i>c</i>	(4) Phthalylglycyl- glycin, Amino-N in 2 ccm (in mg) <i>d</i>	<i>d - c</i>
0	0,134	0,134	0	0,134	0,134	0
17	0,146	0,235	0,089	0,134	0,146	0,012
48	0,168	0,258	0,090	0,140	0,157	0,017
120	0,171	0,285	0,114	0,158	0,209	0,051
144	0,169	0,293	0,124	0,158	0,226	0,068

Versuch 3.

0,25 g Edestin wurden in 12,5 ccm 1 % iger Sodalösung und 10 ccm Wasser gelöst und unter Zusatz von 2,5 ccm aktivierten (5) oder 2,5 ccm nichtaktivierten Pankreasextraktes (6) und je 5 ccm Toluol bei 37°C. digeriert.

TABELLE XIII.

Stunden	(5) Kontrolle Amino-N in 2 ccm (in mg) <i>a</i>	(5) Edestin Amino-N in 2 ccm (in mg) <i>b</i>	<i>b - a</i>	Zunahme	(6) Kontrolle Amino-N in 2 ccm (in mg) <i>c</i>	(6) Edestin Amino-N in 2 ccm (in mg) <i>d</i>	<i>d - c</i>	Zunahme
0	0,134	0,156	0,022	—	0,134	0,156	0,022	—
17	0,146	0,672	0,526	0,504	0,134	0,190	0,056	0,034
48	0,168	1,064	0,896	0,874	0,140	0,235	0,095	0,073
120	0,171	1,539	1,368	0,346	0,158	0,316	0,158	0,136
144	0,169	1,568	1,399	0,377	0,158	0,344	0,186	0,164

Versuch 4.

0,25 g Gelatin wurden in 12,5 ccm 1 % iger Sodalösung und 10 ccm Wasser gelöst und unter Zusatz von 2,5 ccm aktivierten (7) oder 2,5 ccm nichtaktivierten Pankreasextraktes (8) und je 5 ccm Toluol bei 37°C. digeriert.

TABELLE XIV.

Stunden	(7) Kontrolle Amino-N in 2 ccm (in mg) <i>a</i>	(7) Gelatin Amino-N in 2 ccm (in mg) <i>b</i>	<i>b - a</i>	Zunahme	(8) Kontrolle. Amino-N in 2 ccm (in mg) <i>c</i>	(8) Gelatin. Amino-N in 2 ccm (in mg) <i>d</i>	<i>d - c</i>	Zunahme
0	0,134	0,156	0,022	—	0,134	0,156	0,022	—
17	0,146	0,246	0,100	0,078	0,134	0,196	0,062	0,040
120	0,171	0,536	0,365	0,343	0,158	0,214	0,056	0,034
144	0,169	0,541	0,372	0,350	0,158	0,220	0,062	0,040

Versuch 5.

0,066 g Glycylglycin wurden in 12,5 cem 1 % iger Sodalösung und 10 cem Wasser gelöst und unter Zusatz von 2,5 cem aktivierten (9) oder 2,5 cem nichtaktivierten Pankreasextraktes (10) und je 5 cem Toluol bei 37°C. digeriert.

TABELLE XV.

Stunden	(9) Kontrolle Amino-N in 2 cem (in mg) <i>a</i>	(9) Glycylglycin Amino-N in 2 cem (in mg) <i>b</i>	<i>b - a</i>	Zunahme	(10) Kontrolle Amino-N in 2 cem (in mg) <i>c</i>	(10) Glycylglycin Amino-N in 2 cem (in mg) <i>d</i>	<i>d - c</i>	Zunahme
0	0,134	0,826	0,692	—	0,134	0,837	0,703	—
17	0,146	1,120	0,974	0,282	0,134	1,109	0,975	0,272
48	0,168	1,266	1,098	0,406	0,140	1,254	1,114	0,411
120	0,171	1,311	1,140	0,448	0,158	1,308	1,150	0,447
144	0,169	1,354	1,185	0,493	0,158	1,344	1,186	0,483

X. WIRKUNG DES NACH DEM ADSORPTIONSVERFAHREN
GETRENNTEN GLYCERINEXTRAKTS DES GETROCKNETEN
PANKREASPULVERS AUF BENZOYLGLYCYLGLYCIN,
PHTALYLGLYCYLGLYCIN, GLYCYLGLYCIN
UND EDESTIN.

Die Adsorption, um Trypsin und Erepsin zu trennen, wurde in folgender Weise nach der Beschreibung von E. Waldschmidt-Leitz und A. Harteneck (1925) ausgeführt.

10 g Pankreaspulver wurden mit 60 cem Glycerin und 40 cem Wasser unter Zusatz von etwas Toluol bei 37°C. 8 Stunden lang aufbewahrt.

Dann wurde durch Zentrifugieren und Dekantation eine klare Flüssigkeit erhalten. 3,5 cem dieses Glycerinextraktes wurden mit dem gleichen Volumen Wasser verdünnt und nach Zusatz von 0,08 cem n-Essigsäure der Adsorption mit 1,2 cem Tonerdesuspension (= 13,6 mg Al_2O_3) unterworfen, welche durch

Fällen von Aluminiumsulfat mit Ammoniak hergestellt worden war. Es trennte sich nach dem Zentrifugieren eine gelblich gefärbte Adsorptionsrestflüssigkeit ab, welche nach Neutralisation mit Sodalösung für die Versuche gebraucht wurde.

Versuch 1.

0,2362 g Benzoylglycylglycin wurden in 25 ccm 1 % iger Sodalösung und 20 ccm Wasser gelöst und unter Zusatz von 5 ccm Adsorptionsrestflüssigkeit und 5 ccm Toluol bei 37°C. digeriert.

0,2622 g Phtalylglycylglycin wurden in 45 ccm 1 % iger Sodalösung gelöst und unter Zusatz von 5 ccm Adsorptionsrestflüssigkeit und 5 ccm Toluol bei 37°C. digeriert. Zur Kontrolle wurden 5 ccm Adsorptionsrestflüssigkeit mit 25 ccm 1 % iger Sodalösung und 20 ccm Wasser versetzt und unter Zusatz von 5 ccm Toluol bei 37°C. digeriert. Der Aminostickstoff in 2 ccm wurde nach Van Slyke bestimmt.

TABELLE XVI.

Stunden	Kontrollé Amino-N in 2 ccm (in mg) <i>a</i>	Benzoylglycyl- glycin. Amino-N in 2 ccm (in mg) <i>b</i>	<i>b - a</i>	Phtalylglycyl- glycin. Amino-N in 2 ccm (in mg) <i>c</i>	<i>c - a</i>
0	0,162	0,162	0	0,162	0
20	0,173	0,231	0,058	0,208	0,035
48	0,184	0,276	0,092	0,230	0,046
96	0,194	0,343	0,149	0,320	0,126
144	0,198	0,361	0,163	0,327	0,129

Versuch 2.

0.5 g Edestin resp. 0,1321 g Glycylglycin wurden in 25 ccm 1 % iger Sodalösung und 20 ccm Wasser gelöst und unter Zusatz von 5 ccm Adsorptionsrestflüssigkeit und 5 ccm Toluol bei 37°C. digeriert.

TABELLE XVII.

Stunden	Kontrolle Amino-N in 2 cem (in mg) <i>a</i>	Edestin Amino-N in 2 cem (in mg) <i>b</i>	<i>b - a</i>	Zunahme	Glycylglycin Amino-N in 2 cem (in mg) <i>c</i>	<i>c - a</i>	Zunahme
0	0,162	0,231	0,069	—	0,867	0,705	—
20	0,173	0,692	0,519	0,450	0,886	0,713	+0,008
48	0,184	0,782	0,598	0,529	0,886	0,702	-0,003
96	0,194	0,972	0,778	0,709	0,904	0,710	+0,005
144	0,198	1,049	0,851	0,782	0,898	0,700	-0,005

Aus den Resultaten mit Aktivierung und dem Adsorptionsverfahren ging hervor, dass der Benzoylglycylglycin und Phtalylglycylglycin hydrolysierende Faktor der Pankreasdrüse durch Aktivierung günstig beeinflusst wird und seine Wirkung sich in der Trypsinfraktion der Pankreasfermente geltend macht. Danach ist es sehr wahrscheinlich, dass Pankreaserepsin Benzoylglycylglycin und Phtalylglycylglycin nicht angreifen kann, sie aber durch Pankreastrypsin selbst oder ein dem Trypsin sehr nahe verwandtes Ferment gespalten werden.

Zum Schluss möchte ich an dieser Stelle Herrn Prof. Dr. K. Mayeda meinen verbindlichsten Dank für die freundliche Leitung und seine wertvollen Winke bei der Ausführung der Versuche aussprechen.

LITERATUR.

- Imai, T. (1924): Zeitschr. f. physiol. Chem., **136**, 205.
Waldschmidt-Leitz, E. u. Harteneck, A. (1925): Zeitschr. f. physiol. Chem., **147**, 286.

INDEX TO VOLUME IX.

- ADRENALIN**, Antagonistische Wirkung der Gallensäuren gegen — (I) 261.
- Adrenalingehalt, Über den Einfluss des Gallensäureverlustes und der überschüssigen Gallensäurezufuhr auf den — der Nebenniere. 445-
- Aldehydase, The role of ferrous salt as — 187.
- Alkalische Reaktion, Über die Entstehung der — — des Darmsaftes. 1.
- Alkaloide, Über den Einfluss der innersekretorischen Substanzen der Parasympathicusgifte der — und der verschiedenen Salze auf die hypoglykämische Wirkung der Gallensäure. 229.
- ANDO, Kunio. On the significance of iron in biological oxidation. I. The role of ferrous salt as aldehydase. 187.
- ANDO, Kunio. On the significance of iron in biological oxidation. II. The role of ferrous salt as oxidoreductase for various organic substance. 201.
- ANDO, Kunio. Über die Kolloidstabilität schwer löslicher Salze. 215.
- Antagonistische Wirkung der Gallensäuren gegen Adrenalin .I. 261.
- Antirachitic property, On the — — of crude "Biosterin" the cholesterol-free unsaponifiable fraction of cod liver oil. 233.
- Auxosubstances, On the signification of some — in the urease reaction. 347.
- Avitaminosen und Gallensäureausscheidung in der Galle. 321.
- BENZOYLGLYCYLGLYCIN**, Über die Wirkung der Gewebsproteasen auf — und Phtalylglycylglycin. 465.
- , Über die Wirkung der Pankreasproteasen auf — und Phtalylglycylglycin. 483.
- , Über die Wirkung der proteolytischen Ferment auf die — und Phtalylivate der Polypeptide. 453.
- Biochemical studies, in the equilibrium of the halogen ions. I. On the combination and the halogen ions. 17.
- Biochemical studies on uric acid. 117.
- Biological oxidation, On the significance of iron in — —. 187. 201.
- Biosterin, On the antirachitic property of crude " — ", the cholesterol-free unsaponifiable fraction of cod liver oil. 233.
- Blood fluid, On the restitution of the — — after haemorrhage. 87.
- Blood serum, On the conditions which influence the colloidal osmotic pressure of the — —. 45.
- Blut, Über den Einfluss des Gallensäureverlustes und der überschüssigen Zufuhr der Gallensäure auf den Zuckergehalt des — es. 271.
- COD** liver oil, On the antirachitic property of crude "Biosterin" the cholesterol-free, unsaponifiable fraction of — — —. 233.
- Colloidal, On the conditions which influence the — osmotic pressure of the blood serum. 71.

- DARMEREPSIN**, Über die Wirkung des —s und der Hefeproteasen auf Phtalylglycylglycin und Phtalylidiglycylglycin. 453.
- Darmsaft, Über die Entstehung der alkalischen Reaktion des —es. 1.
- Determination, On the micromethod of the — of phosphorus in tissue. 45.
- EDA**, Genichiro. Einfluss des Ergotamins auf experimentelle Hyperglykämie. 285.
- Egg-albumin, On the combination of — and the halogen ions. 17.
- Empirical equation, On the — for gelation velocity. 103.
- Ergotamin, Einflüsse des —s auf experimentelle Hyperglykämie. 285.
- Erythrocyten, Das Lysinogen der — und seine neue Reaktion. 435.
- Equilibrium, Biochemical studies in the — of the halogen ions. 17.
- FERROUS** salt, The role of — as aldehydase. 187.
- , The role of — as oxido-reductase for various organic substance. 201.
- Fischgalle, Über die Kenntniss von der —. 333.
- GALLE**, Avitaminosen und Gallensäureausscheidung in der —. 321.
- Gallensäure, Antagonistische Wirkung der — gegen Adrenalin. I. 261.
- Gallensäure, Bedeutung der — im Kohlenhydratstoffwechsel. 261, 271, 445.
- Gallensäure, Über den Einfluss der innersekretorischen Substanzen der Parasympathicusgifte der Alkaloide und der verschiedenen Salze auf die hypoglykämischen Wirkung der —. 229.
- Gallensäuren, Über die Pentosurie bei experimentellen Staungsikterus und bei subcutaner Zufuhr der —en bei Kaninchen. 251.
- Gallensäureausscheidung, Avitaminosen und — in der Galle. 321.
- Gallensäurebildung, Über die —. 321.
- Gallensäureverlustes, Über den Einfluss des — und der überschüssigen Gallensäurezufuhr auf den Adrenaliningehalt der Nebenniere. 445.
- Gallensäurezufuhr. Über den Einfluss des Gallensäureverlustes und der überschüssigen — auf den Adrenaliningehalt der Nebenniere. 445.
- Gelation velocity, On the empirical equation for —. 103.
- Gewebsprotease, Über die Wirkung der — an Benzoyl und Phtalylglycylglycin. 465.
- Glycocholate solution, The effect of the addition of protein on the surface tension of sodium —. 353.
- Glykolyse, Hämolyse und —. 243.
- HAEMORRHAGE**, On the restitution of the blood fluid after —. 87.
- Halogen ions, Biochemical studies in the equilibrium of the —. 17.
- Hämolyse, Über die spezifische —. 407, 423, 435.
- Hämolyse und Glykolyse. 243.
- HATAKEYAMA, Takuichi. Über die Kenntniss von der Fischgalle III. 333.

- Hefeprotease, Über die Wirkung des Darmerepsins und der —n auf Phtalylglycylglycin und Phtalylglycylglycin. 453.
- HIROTA, Kozo. On the conditions which influence the colloidal osmotic pressure of the blood serum. 71.
- HIROTA, Kozo. On the empirical equation for gelation velocity. 103.
- HIROTA, Kozo. On the restitution of the blood fluid after haemorrhage. 87.
- HORINO, Keiichi. Über die spezifische Hämolysse. 407, 423, 435.
- Hyperglykämie, Einfluss des Ergotamins auf experimentelle Hyperglykämie. 285.
- Hypoglykämische Wirkung, Über den Einfluss der innersekretorischen Substanzen der Parasympathicusgifte der Alkaloide und der verschiedenen Salze auf die — — der Gallensäure. 229.
- INVERTIN**, Über die parenterale Zufuhr des Rohrzucker und —. 438.
- Iron. On the the significance of iron in biological oxidation. 187, 201.
- Irô, Kinshiro. Biochemical studies in the equilibrium of the halogen ions. I. On the combination of egg-albumin and the halogen ions. 17.
- IZUME, Seichi. Studies on experimental rickets. I. On the antirachitic property of crude "Biosterin" the cholesterol-free unsaponifiable fraction of cod liver oil. 233.
- KANINCHEN**, Über die Pentosurie bei experimentellen Stauungsikterus und bei subcutaner Zufuhr der Gallensäuren bei —. 251.
- KAWASHIMA, Shin-ichi. Über den Einfluss der Splanchnicotomie auf die Zuckerausscheidungsschwelle. 335.
- KITAGAWA, Matsumosuke. On the signification of some auxosubstances in the urease reaction. 347.
- KOBAYASHI, Toni. Über die Pentosurie bei experimentellen Stauungsikterus und bei subcutaner Zufuhr der Gallensäuren bei Kaninchen. 251.
- Kohlenhydratstoffwechsel, Bedeutung der Gallensäure im —. 261, 271, 445.
- Kolloidstabilität, Über die — schwer löslicher Salz. 216.
- KOMATSUBARA, Isao. Studies on experimental rickets. I. On the antirachitic property of crude "Biosterin", the cholesterol-free unsaponifiable fraction of cod liver oil. 233.
- LYSINOGEN**, Das — der Erythrocyten und seine neue Reaktion. 435.
- MEERSCHWEICHENSERUM**, Ferment in dem —; 423.
- Micromethod, On the — of the determination of phosphorus in tissue. 45.
- MURAKAMI, Kanae. Bedeutung der Gallensäure im Kohlenhydratstoffwechsel (IV) Antagonistische Wirkung der Gallensäure gegen Adrenalin (I) 261.
- MURAKAMI, Kanae. Über die Gallensäurebildung. II. Avitaminosen und Gallensäureausscheidung in der Galle. 321.

- NAITO**, Yasushi. On the micro-method of the determination of phosphorus in tissue. 45.
- Nebenniere, Über den Einfluss des Gallensäureverlustes und der überschüssigen Gallensäurezufuhr auf den Adrenalingehalt der ——. 445.
- Neue Reaktion, Das Lysinogen der Erythrocyten und seine ——. 435.
- NOSHI**, Katsumasa. Hämolyse und Glykolyse. 243.
- ODA**, Toshio. Über die parenterale Zufuhr des Rohrzucker und Invertins. 383.
- OKAMURA**, Über die Kenntniss von der Fischgalle III. 333.
- OKAMURA**, Teiji. Bedeutung der Gallensäure im Kohlenhydratstoffwechsel. VI. Über den Einfluss des Gallensäureverlustes und der überschüssigen Gallensäurezufuhr auf den Adrenalingehalt der Nebenniere. 445.
- OKAMURA**, Teiji. Bedeutung der Gallensäureverlustes und der überschüssigen Zufuhr der Gallensäure auf den Zuckergehalt des Blutes. 271.
- Oxidation, On the significance of iron in biological ——. 201.
- OYAMA**, Kensa. Über die Entstehung des alkalischen Reaktion des Darmsaftes. 1.
- PANKREASPROTEASE**, Über die Wirkung der —n auf Benzoyl und Phtalylglycylglycin. 483.
- Parasympathicusgifte, Über den Einfluss der innersekretorischen Substanzen der — der Alkaloide und der verschiedenen Salzen auf die hypoglykämische Wirkung der Gallensäure. 229.
- Parenterale Zufuhr, Über die ——— des Rohrzucker und Invertins. 383.
- Pentosurie, Über die — bei experimentellen Stauungsikterus und bei subcutaner Zufuhr der Gallensäuren bei Kaninchen. 251.
- Phosphorus, On the micromethod of determination of — in tissue. 45.
- Phtalylglycylglycin, Über die Wirkung des Darmerepsins und der Hefeproteasen auf — und Phtalyl-diglycylglycin. 453.
- Phtalylglycylglycin, Über die Wirkung der Gewebsproteasen auf Benzoyl- und —. 465.
- Phtalylglycylglycin, Über die Wirkung des Darmerepsins und der Hefeproteasen auf Phtalylglycylglycin und —. 453.
- Phtalyl-drivate, Über die Wirkung der protealytischen Ferment auf die Benzoyl- und — der polypeptide. 453.
- Phtalylglycylglycin, Über die Wirkung der Pankreasproteasen auf Benzoyl- und Phtalylglycylglycin. 483.
- Protein, The effect of the addition of — on the surface tension of sodium glycocholate solution 353.
- Proteolytische Fermente, Über die Wirkung der — auf die Benzoyl- und phtalyl-drivate der Polypeptide. 445.
- REAKTION**, Über die Entstehung der alkalischen — des Darmsaftes. 1.
- Ricket, Studies on experimental —. 233.
- Rohrzucker, Über die parenterale Zufuhr des — Invertins. 383.
- SALT**, The role of ferrous — as aldehyde. 187.

- Salze, Über den Einfluss der innersekretorischen Substanzen der Parasympathicusgifte der Alkaloide und der verschiedenen — auf die hypoglykämische Wirkung der Gallensäure. 229.
- Salz, Über die Kolloid-stabilität schwer löslicher —. 215.
- Splanchnicotomie, Über den Einfluss der auf die Zuckerausscheidungs-schwelle. 335.
- SHIMODA, Tokusaburo. Biochemical studies on uric acid. 117.
- Stauungsikterus, Über die Pentosurie bei experimentellen — und bei subcutaner Zufuhr der Gallensäuren bei Kaninchen. 251.
- SUGINO, Ryuzo. The effect of the addition of protein on the surface tension of sodium glycocholate solution. 353.
- Surface tension of sodium, The effect of the addition of protein on — — — glycocholate solution. 353.
- TAKU, Aijiro. Über den Einfluss der innersekretorischen Substanzen der Parasympathicusgifte der Alkaloide und der verschiedenen Salze auf hypoglykämische Wirkung der Gallensäure. 229.
- Tissue, On the micro method of the determination of phosphorus in —. 45.
- UNSAAPONIFIABLE fraction, On the antirachitic property of crude "Biosterin" the cholesterin-free — of cod liver oil. 233.
- Urease reaction, On the signification of some auxosubstances in the —. 347.
- Uric acid, Biochemical studies on —. 117.
- UTZINO, Senji. Über die Wirkung des Darmerepsins und der Hefeproteasen auf Phtalylglycylglycin und Phtalylidiglycylglycin. 453.
- UTZINO Senji. Über die Wirkung der Gewebsproteasen auf Benzoyl- und Phtalylglycylglycin. 465.
- UTZINO, Senji. Über die Wirkung der Pankreasproteasen auf Benzoyl- und Phtalylglycylglycin. 483.
- ZUCKERAUSSCHIEDUNGSSCHWELLE, Über den Einfluss der Splanchnicotomie auf die —. 335.
- Zuckergehalt, Über den Einfluss des Gallensäureverlustes und der überschüssigen Zufuhr der Gallensäure auf den — des Blutes. 271.

